

Untersuchungen zur spezifischen zellulären
Immunität bei Neugeborenen

Cornelie Elisabeth Burr

1973

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 25563
Printed in Germany

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. Betke

Abteilung für antimikrobielle Therapie

Leiter: Professor Dr. Marget

Untersuchungen zur spezifischen zellulären
Immunität bei Neugeborenen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Cornelie Elisabeth B u r r

aus

Staufen

München 1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Marget
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Betke
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1973

Übersicht

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	1
B. <u>Fragen der Neugeborenen-Immunologie</u>	2
I. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen	2
II. Abwehrsysteme des Körpers	2
III. Das zelluläre Immunsystem	3
IV. Immuntoleranz und "Runt Disease"	5
V. Immunontogenese	6
VI. Immunkompetenz bei menschlichen Neugeborenen	8
C. <u>Lymphozytentransformation in vitro</u>	9
I. Lymphozytentransformation	9
II. Geschichte der Lymphozytentransformation	9
III. Die verschiedenen Untersuchungstechniken	11
IV. Spezifische und unspezifische Stimulation	13
V. Lymphozytenstimulation mit Nabelschnurlymphozyten	14
D. <u>Material und Methode</u>	17
I. Ansatz der Lymphozytenkulturen	17
II. Radioaktive Markierung und Messung des Thymidineinbaus	18
III. Berechnung und Auswertung der Ergebnisse	19
IV. Untersuchungsmaterial	20
V. Bestimmung der Immunglobuline	20
VI. Antikörpertiterbestimmung (passive Hämagglutination)	20
VII. Verwendetes Arbeitsmaterial	21
E. <u>Ergebnisse</u>	
F. <u>Diskussion</u>	
G. <u>Zusammenfassung</u>	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Mit der Einführung der antibiotischen Therapie haben bakterielle Infektionen zwar an Schrecken verloren, aber in der Kinderheilkunde spielen sie noch immer eine erhebliche Rolle. Nicht selten sind bei Neugeborenen bakterielle Infektionen auch heute noch die Krankheits- oder gar Todesursache. Ihre vermehrte Anfälligkeit gegen gramnegative Erreger - auch solche, die für ältere Kinder und Erwachsene nur wenig oder gar nicht pathogen sind - läßt vermuten, daß bei Neugeborenen eine physiologisch bedingte Abwehrschwäche vorliegen könnte.

In dieser Arbeit soll durch Untersuchungen an Lymphozyten ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, ob das zelluläre Immunsystem zum Zeitpunkt der Geburt schon funktionell voll ausgereift ist oder nicht, und ob sich in vitro ein Unterschied zwischen der Reaktion von Nabelschnurlymphozyten und der Reaktion von normalen Erwachsenenlymphozyten feststellen läßt.

Zu diesem Zweck bestimmten wir den Einbau von radioaktivem Thymidin in die neusynthetisierte DNA von peripheren Lymphozyten nach Zugabe von PHA bzw. E.coli zu unseren Lymphozytenkulturen. Außerdem wollten wir feststellen, ob zwischen E.coli-Antikörpertiterwerten, Immunglobulinspiegel und Ergebnis der Lymphozytenstimulation mit E.coli-Antigen ein Zusammenhang besteht. - Zu unseren Versuchen verwendeten wir Nabelschnurblut von gesunden Neugeborenen und Venenblut von gesunden Erwachsenen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Abteilung für antimikrobielle Therapie (Leiter Prof.Dr.W.Marget) der Universitäts-Kinderklinik München durchgeführt.

B. Fragen der Neugeborenenimmunologie

I. Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen

Neugeborene und Frühgeborene sind für bakterielle Infektionen deutlich anfälliger als ältere Kinder oder Erwachsene (94,101). Von 10 000 Neugeborenen erkranken etwa 30 an einer Sepsis (103,105). Bis zu 90 % der erkrankten Kinder sterben daran (106). Nach Schätzungen beträgt der Anteil der Infektionsletalität an der gesamten Neugeborenensterblichkeit zwischen 5 - 20 % (107). Frühgeborene sind wesentlich häufiger betroffen als ausgereifte Kinder. Je jünger und unreifer die Neugeborenen sind, desto eher neigen sie auch zu Infektionen durch banale Keime, die sonst wenig oder gar nicht pathogen sind (101,107,104). Die in diesem Zusammenhang hinsichtlich der Reifung des Immunsystems auftauchenden Fragen waren der Anlaß für unsere Untersuchungen.

II. Abwehrsysteme des Körpers

Die Widerstandsfähigkeit des Körpers gegenüber Infektionen wird durch verschiedene Abwehrmechanismen bewirkt. Das sind auf der einen Seite die natürliche Immunität als unspezifische Abwehr durch Phagozytose, Entzündungsreaktion und humorale Abwehrstoffe wie Properdin und Interferon, auf der anderen Seite die spezifische Immunität als Fähigkeit des Körpers, auf das Zusammentreffen mit spezifischen Antigenen durch Freisetzung von spezifischen Antikörpern (humoral) oder Produktion von "sensibilisierten" Lymphozyten (zellulär) zu antworten (91,96,104).

III. Das zelluläre Immunsystem

Träger der zellulären Immunantwort sind diejenigen Lymphozyten, die ursprünglich vom Thymus abstammen und deshalb T-Lymphozyten genannt werden. Die sogenannten B-Lymphozyten, von denen man glaubt, daß sie von einem noch nicht entdeckten, der Bursa Fabricii bei Hühnern ähnlichen Organ abstammen, sollen dagegen für die humorale Abwehr mit verantwortlich sein (19,89,91).

Nach der Bindung des Antigens an eine Rezeptorstelle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten soll eine Transformation in blastenähnlichen Zellen mit großem Kern und basophilem Zytoplasma erfolgen. Die dadurch aktivierten Lymphozyten sollen eine Reihe von löslichen Faktoren produzieren, die Dumonde et al. (32) "Lymphokine" nennen. Über den Wirkungsmechanismus und die chemische Natur dieser Faktoren ist wenig bekannt, aber sie scheinen für viele Phänomene, welche im Rahmen einer zellulären Immunantwort auftreten, verantwortlich zu sein, u.a. auch für die Übertragung der Sensibilisierung auf andere noch nicht aktivierte Lymphozyten (32,64,89,91).

Das zelluläre Immunsystem ist an einer ganzen Reihe von immunologischen Vorgängen maßgeblich beteiligt, so z.B. an der Abwehr vieler Bakterien und Viren, an der Abstoßung von Transplantaten und der Ausbildung einer Überempfindlichkeit vom verspäteten Typ (19,91). Auch wenn gleichzeitig eine Antikörperbildung erfolgen kann, so ist doch primär das zelluläre Immunsystem für diese Abwehrphänomene verantwortlich zu machen (19). Das läßt sich im Tierversuch durch selektive Schwächung des zellulären Immunsystems beweisen. So konnte bei thymektomierten (Ratten

eine herabgesetzte Fähigkeit zur Abstoßung von Hauttransplantaten und eine geschwächte Abwehr gegen Tuberkulin (BCG) gefunden werden (20,21,22). Bei Ratten wurde durch Drainage des Ductus Thoracicus eine Abwehrschwäche gegen verschiedene Antigene und eine verzögerte Transplantatabstoßung hervorgerufen. Durch Injektion von Lymphozyten aus dem Ductus Thoracicus anderer Ratten konnte die immunologische Aktivität wieder hergestellt werden (91).

Die Bedeutung der zellulären Immunität für die Beherrschung von Infekten und die Immunantwort vom verspäteten Typ zeigt sich besonders deutlich bei Babys mit angeborener Thymusaplasie. Bei diesen Kindern ist die Produktion von Antikörpern intakt, der Immunglobulinspiegel ist normal, aber trotzdem sind sie so infekтанfällig, daß sie selten länger als ein paar Monate überleben (19,44,51,72,76). Sie entwickeln keine Überempfindlichkeit vom verspäteten Typ und sind unfähig, ein Hauttransplantat abzustoßen (19).

Die T-Lymphozyten sind nicht nur für die Erstantwort des Organismus gegen Fremdstoffe notwendig, sondern in ihnen ist auch das Gedächtnis für Antigene verankert, mit denen der Körper schon einmal in Kontakt gekommen war (Sekundärantwort). Durch diese Lymphozyten scheint der Organismus befähigt, die erneute Zufuhr des Antigens mit einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verspäteten Typ zu beantworten. Diese Überempfindlichkeit läßt sich durch Lymphozyten (55) oder Extrakte aus abgetöteten Lymphozyten (56) von sensibilisierten auf unsensibilisierte Empfänger übertragen (91).

Für die Spezifität der zellulären Immunantwort, wie sie bei der Überempfindlichkeit vom verspäteten Typ zum Ausdruck kommt, gibt es im wesentlichen zwei Erklärungen. Das sind die instruktive Hypothese (15)

und die selektive Hypothese, die hauptsächlich von Burnet (14) vertreten wird. Die instruktive Hypothese besagt, daß unter dem Einfluß des Antigens jeder immunologisch kompetente Lymphozyt zur Abwehrreaktion befähigt werden kann; nach der Selektionstheorie von Burnet trifft jedes mögliche Antigen auf eine für dieses Antigen spezifisch vorgebildete Zellfamilie (Clon). Diese Zellfamilien vererben ihre Spezifität auf ihre Nachkommenschaft. An einer Abwehrreaktion gegen ein bestimmtes Antigen ist also nur der Teil der gesamten Lymphozytenpopulation beteiligt, der für dieses Antigen verantwortlich ist (91,96).

IV. Immuntoleranz und "Runt"-Disease

Bei Mäusen ist die Neugeborenenphase durch das Phänomen der „Immuntoleranz“ gekennzeichnet. Ein Antigenkontakt zu diesem Zeitpunkt führt wegen der Unreife des immunologischen Apparats nicht zu einer Immunantwort, sondern zu einer langdauernden Abwehrunfähigkeit des Organismus gegen das betreffende Antigen, während er gegenüber anderen Antigenen bei späterem Kontakt die volle Reaktionsfähigkeit besitzt. Das Zusammentreffen mit einem Antigen soll im Zustand der immunologischen Unreife entsprechend der Selektionstheorie zu einer Zerstörung des zuständigen Clons und damit zur Eliminierung der für dieses Antigen spezifischen Zellfamilie führen (77,91,96). Bei anderen Tierarten liegt die sensible Phase der Toleranz zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der pränatalen Entwicklung.

Nach der experimentellen Erzeugung von Immuntoleranz bei Tieren konnte ein als Runt-Disease bezeichnetes Syndrom beobachtet werden, wenn immunologisch aktive Zellen als Antigen verwendet wurden (6,76,77,91).

Dieses Syndrom, das mit schweren Krankheitserscheinungen, Wachstumsstillstand und schließlich Tod der betroffenen Tiere einhergeht, wird durch die Aggressivität der fremden Zellen gegen den wehrlosen Empfänger ausgelöst.

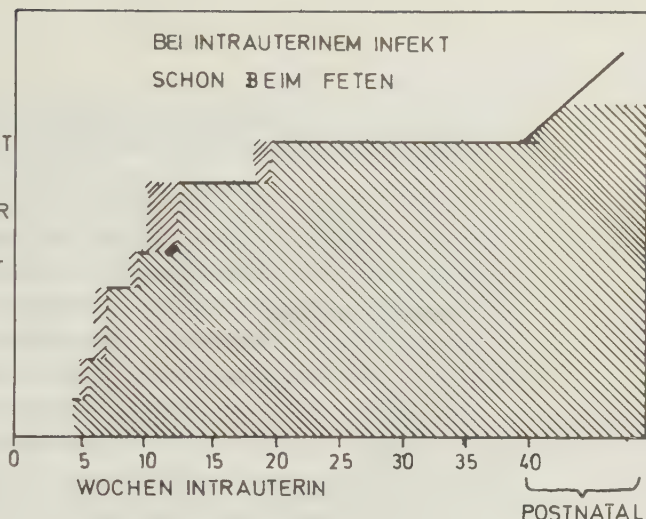
Beim Menschen ist das Auftreten einer Runt-Disease nicht gesichert, wenn auch einige Autoren glauben, in Einzelfällen ein der Runt-Disease ähnliches Krankheitsbild bei Kindern beobachtet zu haben (44,51,72).

V. Immunontogenese

Aus Abbildung 1 (nach Hess, 47) wird ersichtlich, daß während der embryonalen Entwicklung die einzelnen Immunsysteme, sowohl in morphologischer wie in funktioneller Hinsicht, verschieden schnell ausgereift sind. Obwohl schon in der 10. Embryonalwoche der Thymus angelegt, von lymphoiden Zellen besiedelt ist und schon vor der 15. Embryonalwoche periphere Lymphozyten im Blut nachzuweisen sind, entwickelt sich die zelluläre Immunität in funktioneller Hinsicht erst prä- oder postnatal.

MORPHOLOGIE

KEIMZENTREN
PLASMAZELLEN
LYMPHKNOTEN
LYMPHOIDZELLIG BESIEDELT
LYMPHOCYTEN IN BLUT
LYMPHKNOTEN ERKENNBAR
THYMUS
LYMPHOIDZELLIG BESIEDELT
THYMUS ERKENNBAR
LYMPHGEFÄSS-SYSTEM
BLUTGEFÄSS-SYSTEM
PHAGOCYTIERENDE ZELLE



FUNKTIONEN

ZELLGEBUNDENE IMMUNITÄT
SPEZ. HUM. ANTIKÖRPER
IMMUNGLOBULINE
ENTZÜNDUNG
PHAGOCYTOSE

IG A
IG G
IG M

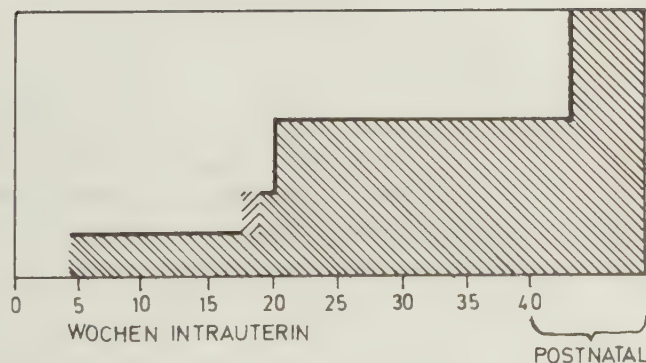


ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ONTOGENETISCHEN ENTWICKLUNG DES IMMUNBIOLOGISCHEN SYSTEMS BEIM MENSCHEN

VI. Immunkompetenz bei menschlichen Neugeborenen

Untersuchungen an menschlichen Neugeborenen und Foeten brachten unterschiedliche Ergebnisse der funktionellen Reifung der zellulären Immunität. Brody u. Wallach (12) konnten nachweisen, daß beim Menschen eine pränatale Sensibilisierung möglich ist, das heißt, daß schon Foeten gegen bestimmte Antigene wie Tuberkulin mit einer Überempfindlichkeit vom verspäteten Typ antworten.

Leikin et al. (57) fanden eine nachweisbare Immunantwort gegen eine ganze Reihe von Antigenen, wie Streptokokken, Pneumokokken und Streptolysin.

Öhme (77) konnte andererseits eine Immuntoleranz bei Frühgeborenen gegen Rinderserum erzeugen.

Silverstein et al. (93) zeigten bei Experimenten mit Lämmern, daß die Immunkompetenz für verschiedene Antigene auch zu jeweils verschiedenen Zeitpunkten manifest wird. Möglicherweise könnte dies auch bei menschlichen Neugeborenen zutreffen.

Die Mehrzahl der Untersucher hält eine Immunkompetenz des Neugeborenen für gesichert (38,57,59,86,93), was zu der erhöhten Infektanfälligkeit in Widerspruch steht.

C. Lymphozytentransformation in vitro

I. Lymphozytentransformation, ein in vitro Test der zellulären Immunität

Ein Vorgang, der mit zellulären immunologischen Reaktionen in vivo vergleichbar ist, ist in vitro die sog. Lymphozytentransformation. Die Lymphozyten als Träger der zellulären Immunität werden durch verschiedene mitogene Substanzen wie Phytohämagglutinin (PHA) oder bakterielle Antigene zu bestimmten Veränderungen stimuliert, die allgemein als Äquivalent zu einer Immunantwort betrachtet werden (Roitt, 91). Diese Veränderungen bestehen in einer Umwandlung der Lymphozyten in große, blastenähnliche Zellen mit basophilem Zytoplasma und einem großen, locker strukturierten Zellkern, einer Erhöhung der Mitoserate und einer gesteigerten Nukleinsäuresynthese als Ausdruck der vermehrten Proliferation.

Mit der Lymphozytentransformation ist ein einigermaßen reproduzierbarer in vitro Test für die Untersuchung der zellulären Immunantwort gegeben, wobei sowohl die Anzahl der transformierten Zellen, als auch die Mitoserate oder die Erhöhung der Nukleinsäuresynthese Grundlage der Messungen sein kann.

II. Geschichte der Lymphozytentransformation

Die ersten Beobachtungen über eine Transformation der Lymphozyten in vitro wurden bereits 1902 von Maximow (67,68) gemacht, der bald danach die These aufstellte, daß mit geeigneten Stimulationsmitteln eine Umwandlung der peripheren Lymphozyten in Blasten eingeleitet werde (68). Seine Arbeiten

gerieten aber weitgehend in Vergessenheit und erst die Gewinnung des Phytohämagglutinins, eines Eiweißextraktes aus der Nierenbohne *Phaseolus vulgaris*, durch Rigas u.Osgood 1955 (90), gab der Lymphozytenforschung unbeabsichtigt neue Impulse.

Die Genetiker Hungerford et al. (50), die PHA seiner hämagglutinierenden Eigenschaften wegen für ihre Blutzellenkulturen verwendeten, beobachteten 1959 zufällig das vermehrte Auftreten von Mitosen und großen mononukleären Zellen. Sie schoben das der Wirkung von PHA zu. Ihre Beobachtungen wurden 1960 von Nowell (74) bestätigt, der ebenfalls nur die morphologischen Befunde beschrieb, ohne einen Zusammenhang zwischen den von ihm beobachteten, teilungsfähigen, blastenartigen Zellen und peripheren Lymphozyten herzustellen. Carstairs (18) konnte dann 1961 als erster klar nachweisen, daß diese Blasten von peripheren Lymphozyten abstammen. Er beschrieb auch genau den zeitlichen Ablauf der Transformationsvorgänge: nach 24 Stunden erscheinen die ersten veränderten Zellen, nach 48 Stunden treten gehäuft Mitosen auf und am 3.Tag besteht fast die gesamte Zellpopulation nur noch aus transformierten Zellen.

1965 fanden Caron et al. (17), daß die morphologischen Veränderungen in PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen mit einer Erhöhung der Nukleinsäuresynthese einhergehen. Die gleichen Beobachtungen machten auch Cooper u.Rubin (25,26). Dabei setzt die RNA-Synthese sofort nach Zugabe des PHA ein, während die DNA-Synthese erst nach 24 Stunden beginnt und am 3.Tag ihren Höhepunkt erreicht hat und somit in zeitlichem Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen zu stehen scheint.

Von besonderer Bedeutung war, als Pearmain et al.(84) 1963 nachweisen konnten, daß auch spezifische Antigene imstande sind, bei Lymphozyten eine Transformation hervorzurufen. Ihre Beobachtungen an Lymphozyten tuberkulinpositiver und tuberkulinnegativer Patienten legten erstmals die Vermutung nahe, daß die Lymphozytentransformation möglicherweise ein Vorgang von immunologischer Bedeutung sei, denn nur die Lymphozyten tuberkulinpositiver Patienten ließen sich zur Blastenbildung stimulieren.

In Arbeiten anderer Autoren wurde bewiesen, daß eine Reihe weiterer Antigene imstande ist, Lymphozyten zu stimulieren. So erzielten Elves et al.(33) an Lymphozyten sensibilisierter Patienten eine Transformation durch Tetanus- und Diphtherietoxoid, Poliomyelitis- und Pockenvaccine, Hirschhorn et al.(48) durch Streptolysin S und Ling et al.(61) durch E.coli-Antigen.

Zellkulturen, welche Lymphozyten von zwei verschiedenen Individuen enthalten, sog."mixed cultures" zeigen nach den Untersuchungen von Bain et al.(4) ebenfalls eine Transformation der kleinen Lymphozyten in Blasten. Das Ausmaß der Transformation steht in Relation zu den genetischen Verschiedenheiten der Zellspender und kann deshalb bei Transplantationen als Maßstab für die Histokompatibilität zwischen Transplantat und Empfänger dienen.

III. Die verschiedenen Untersuchungstechniken

Entsprechend der Vielzahl an morphologischen und biochemischen Vorgängen, die sich bei der Lymphozytentransformation abspielen, entwickelten sich im Laufe der Zeit verschiedene Untersuchungstechniken. Die älteste und am häufigsten verwendete Methode beruht auf der Beurteilung der morphologischen Veränderungen,

die in stimulierten Lymphozytenkulturen auftreten. Von den Kulturen werden Zellausstriche angefertigt, die an der Luft getrocknet, mit Alkohol fixiert und nach Pappenheim gefärbt werden. Unter dem Mikroskop wird dann die Zahl der Blasten ausgezählt (Hungerford, Nowell) (50,74). Da die Übergänge zwischen Lymphozyt und Lymphoblast fließend sind und es von der Beurteilung des jeweiligen Beobachters abhängt, ob er eine Zelle noch für einen Lymphozyten oder schon für einen Blasten hält, sind die Ergebnisse bei dieser Methode schwer miteinander zu vergleichen. Das gilt auch, etwas abgeschwächt, für die Auszählung der Mitoseraten.

Eine Alternative zur morphologischen Auswertung bieten die Autoradiographie nach Donia u. Pelc (31) und die Liquid-szentillations-Methode nach Sørensen et al. (95). Beide Methoden beruhen darauf, daß die Lymphozyten bei ihrer Umwandlung in Blasten vermehrt Desoxyribonukleinsäure (DNA) synthetisieren. Zu dieser Synthese benötigen die Zellen unter anderem als Baustein das Nukleosid Thymidin, das in Form des radioaktiv markierten ^3H -Thymidins den Lymphozytenkulturen beigelegt werden kann.

Bei der Autoradiographie werden nach Beendigung der Inkubationszeit Zellausstriche angefertigt, mit Striping-Film beschichtet und einige Tage in der Dunkelkammer gelagert. Die β -Strahlung des in die transformierten Zellen eingebauten ^3H -Thymidins belichtet den Film an den radioaktiv markierten Stellen. Nach der Entwicklung des Films wird das Ausstrichpräparat nach Pappenheim gefärbt und das Verhältnis von markierten und unmarkierten Zellen bestimmt (31).

Bei der Liquid-Szentillations-Zählung wird bei standardisierter Zellzahl der Thymidineinbau pro Kultur ermittelt und mit dem Einbau in Kontrollkulturen ohne Antigenzusatz verglichen. Dabei gilt als Maßstab für

die Höhe des Einbaus die Radioaktivität der Lymphozytenkultur, die in radioaktiven Zerfallseinheiten/Minute (counts per minute) mit entsprechenden Meßgeräten ermittelt werden kann (17,95). Die Liquid-Szintillationsmethode scheint ein objektiverer Maßstab für den Stimulationseffekt zu sein, als das Auszählen der transformierten Zellen, da das Ergebnis nicht von der Beobachtungsgabe des Untersuchers abhängt (17,102, 80,82). Aus diesem Grunde haben wir für unsere Untersuchungen diese Methode gewählt.

IV. Spezifische und unspezifische Stimulation

Alle Untersucher, gleichgültig mit welcher Methode sie gearbeitet haben, berichten übereinstimmend, daß bei Stimulation mit PHA die Rate der Lymphozytentransformation immer wesentlich höher lag als bei Verwendung eines spezifischen Antigens (12,48,58,61,62,81). Im Gegensatz zu spezifischen Antigenen ist auch keine vorherige Sensibilisierung des Lymphozytenspenders nötig, um eine in vitro Antwort auf PHA hervorzurufen. Ferner ist der zeitliche Ablauf des Transformationsvorganges in beiden Fällen unterschiedlich. Bei Verwendung von PHA als Stimulationsmittel wird das Maximum der Antwort bereits am 3.Tag, bei Anwendung spezifischer Antigene am 5.-7.Tag erreicht.

Dies hat dazu geführt, daß einige Autoren (24,26,40,45) bezweifeln, ob die Antwort der Lymphozyten auf PHA überhaupt die Manifestation eines immunologischen Phänomens ist, während andere (84,60,62,33,69) PHA für ein unspezifisches Antigen halten, für das im Gegensatz zu spezifischen Antigenen nicht nur eine einzelne Zellfamilie zuständig ist, sondern die Gesamtzahl der immunkompetenten T-Lymphozyten. Da keine Sensibilisierung nötig ist, ist die Reaktion auf PHA möglicherweise eine Primärantwort, vergleichbar einer Transplantatabstoßung (59),

während die Reaktion auf spezifische Antigene eine Sekundärantwort darstellt (16,84).

Die Ansicht, daß PHA als Antigen wirkt, wird durch die Beobachtung bestärkt, daß eine Antikörperbildung gegen PHA in vivo nachgewiesen werden kann (1,69). Bei bestimmten Erkrankungen, welche mit einer Unfähigkeit zu zellgebundenen Abwehrreaktionen einhergehen, findet sich gleichzeitig eine Unfähigkeit der peripheren Lymphozyten, auf PHA zu reagieren. Zu diesen Krankheiten gehören u.a. Thymusatresie (49), Lepra(10), Hypogammaglobulinämie (34) und Morbus Hodgkin (30).

Wenn PHA tatsächlich ein unspezifisches Antigen ist, dann ist die Reaktion der Lymphozyten auf PHA ein guter Maßstab für die Funktion des gesamten zellulären Immunsystems, während durch Verwendung eines spezifischen Antigens in vitro die Immunantwort vom verzögerten Typ gegen das betreffende Antigen untersucht werden kann. Auch dann, wenn es sich nicht um eine eigentliche Immunreaktion handelt, kann die PHA-Stimulation einer Antigen-Stimulation gleichgesetzt und als Maß für die Aktivität der Lymphozyten verwendet werden.

V. Lymphozytenstimulation mit Nabelschnurlymphozyten

Das Verhalten von Nabelschnurlymphozyten nach in vitro Stimulation mit PHA wurde schon früher von verschiedenen Autoren untersucht. Ihre Ergebnisse variieren aber beträchtlich, so daß eine sichere Aussage darüber bis jetzt noch nicht möglich ist.

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der bisherigen Arbeiten mit Angabe der verwendeten Auswertungsmethode.

Tabelle 1: Ergebnisse anderer Autoren bei der Stimulation von Neugeborenen-Lymphozyten mit PHA - im Vergleich zu erwachsenen Kontrollpersonen.

Autor	Methode	Ergebnisse
Lindahl-Kiessling et al. (59)	Morphologisch	+
Elves et al. (34)	Morphologisch	-
Epstein et al. (35)	Autoradiographie	+
Winter et al. (100)	Autoradiographie	++
Lischner et al. (63)	Morphologisch	+
Oehme (78)	Morphologisch	+
Colombies et al. (23)	Morphologisch	-
Burgio et al. (13)	Morphologisch	-
Prindull (86)	Morphologisch	++

schwächere Reaktion der Neugeborenen-Lymphozyten	=	-
vergleichbare " " "	=	+
stärkere " " "	=	++

Da in der Altersgruppe der Neugeborenen *Escherichia coli* (*E.coli*) hinsichtlich der Häufigkeit und klinischen Bedeutung an erster Stelle unter den bakteriellen Sepsiserregern steht (5,71,88,94,106,107), verwendeten wir neben dem unspezifisch wirkenden PHA ein definiertes Antigen von *E.coli*, um die Reaktion der Neugeborenen-Lymphozyten auf spezifische Antigene zu überprüfen.

Zu diesem Thema liegen bereits die Arbeiten von Brody u.Wallach (12) und Leikin et al. (57) vor, die ebenfalls mit *E.coli*-Antigen gearbeitet haben. Soweit sich bis jetzt darüber sagen läßt, scheint nur in Ausnahmefällen eine Stimulation der Nabelschnurlymphozyten durch *E.coli* möglich zu sein.

Unser Ziel war es, die Ergebnisse bei Verwendung von PHA und *E.coli* zwischen den Gruppen der Neugeborenen und der Erwachsenen zu vergleichen. Eine schwächere Reaktion der Nabelschnurlymphozyten auf diese beiden Stimulationsmittel würden wir dahingehend interpretieren, daß die vermehrte Infektanfälligkeit im Neugeborenenalter auf eine teilweise Unreife des zellulären Teils der Abwehr zurückzuführen ist.

Die Untersuchungen mit *E.coli* verbanden wir mit einer Bestimmung des jeweiligen Antikörpertiters gegen *E.coli* und der entsprechenden Immunglobulinspiegel, um gleichzeitig einen Zusammenhang des humoralen mit dem zellulären Immunsystem zu untersuchen.

D. Material und Methode

I. Ansatz der Lymphozytenkulturen

Zur Untersuchung wurden unter sterilen Bedingungen etwa 15-20 ml Nabelschnurblut von gesunden Neugeborenen in ein Reagenzglas abgenommen, das 0,4 ml Heparin (Liquemin^R) und 1,6 ml 6%iges Dextran (Macrodex^R) enthielt. Bei Erwachsenen wurden 20 ml Venenblut aus den Cubitalvenen in einer ebenso vorbereiteten Spritze aufgezogen. Das Blut wurde leicht geschüttelt, um es gut mit Heparin und Dextran zu mischen und dann zur Sedimentation aufrecht in den Brutschrank gestellt. Bei einer konstanten Temperatur von 37° C wurde es dort 1-2 Stunden aufbewahrt.

Der zellreiche Plasmaüberstand wurde in ein Zentrifugenglas mit abgerundetem Boden vorsichtig abpipettiert, um möglichst wenig Erythrozyten mitzunehmen und 10 Minuten lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig wieder abpipettiert und zur Weiterverwendung im Tiefkühlfach eingefroren.

Die Leukozyten, die sich am Grund des Zentrifugengläschens abgesetzt hatten, wurden in 10 ml TC Medium 199 wieder aufgeschwemmt.

Nach einem Viability-Test mit Trypanblau und einer Zellzählung wurde die Suspension auf 750000 mononukleäre Zellen eingestellt, wobei die fertiggestellte Kulturlösung immer 20 % gepooltes, frisch bei 56° C inaktiviertes und steriles menschliches AB-Plasma und 100 Einheiten Mischantibiotika pro ml enthielt.

In sterilen Zentrifugengläschen wurden Dreifach-

Kulturen in 2 ml angesetzt. Unspezifisches Mitogen und spezifisches Antigen wurden in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt:

PHA 0,002 ml / und 0,003 ml / 0,02 ml

E.coli 0,1 ml / 0,5 ml / 0,02 ml .

Dabei betrug das absolute Volumen der zugefügten Antigenlösung 0,1 ml. Kontrollkulturen blieben ohne Antigenzusatz.

Alle Kulturgefäße wurden mit Papierstopfen verschlossen und im Brutschrank bei 37° C / 3 bzw. 5 Tage inkubiert.

Sterilitätskontrollen wurden in verschiedenen Zeitabständen durchgeführt, indem vom Überstand Ausstriche mit einer Platinöse auf Blut-Agar und Tundo-Agar-Platten gemacht wurden.

II. Radioaktive Markierung und Messung des Einbaus von H³-Thymidin in lymphozytäre DNS (nach Sørensen et al., 95)

Zwei Stunden vor Beendigung der Inkubationszeit wurden jeder Kultur 2 µc H³-Thymidin zugefügt. Nach Ablauf von 2 Stunden wurden die Kulturen in ein Eisbad gestellt und je ein Tropfen "kaltes" Thymidin zugefügt, um den weiteren Einbau von H³-Thymidin in die Zellen zu stoppen.

So unterbrochene Kulturen wurden 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein Spezialgefäß pipettiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um alles nicht eingebaute Thymidin vollständig zu entfernen.

Nach dem Waschen wurde die Zellsuspension über einer Sartorius Glasfilteranlage unter Vakuum auf Glasfaser-

filter abgefiltert. Eventuelle Zellrückstände in den Kulturgläschen wurden mit 5 ml kalter physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und ebenfalls über die Filteranlage aufgefangen.

Die Proteinbestandteile der Zellen wurden auf dem Filter mit 10 ml 5%iger Essigsäure ausgefällt und mit 10 ml kaltem Methanol nachgewaschen.

Das Filterblättchen mit dem Zellpräzipitat wurde dann in ein Scintillationsgläschen gelegt, so, daß die Seite mit den ausgefallten Proteinen oben war. Dann wurde es mindestens 1 Stunde im Sterilisator bei 150° C getrocknet. 5 ml Scintillationsflüssigkeit wurden jedem Gläschen beigelegt.

Alle Proben wurden 10 Minuten im Packard gezählt und der jeweilige Einbau an H³-Thymidin in "counts per minute" ausgedrückt.

Ein leeres Standardgläschen, das nur 5 ml reine Scintillationsflüssigkeit enthielt, wurde jedesmal zur Bestimmung des radioaktiven "Backgrounds" mitgezählt.

Wegen gleichen Quenchgrades der einzelnen Proben wurde eine Quenchkorrektur nicht durchgeführt.

III. Berechnung und Auswertung der Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt eine Darstellung der Methode zur besseren Übersicht.

Von jedem Meßwert wurde der ermittelte Backgroundwert abgezogen, das ist die Zahl der radioaktiven Emissionen, die in Leerproben ohne Zusatz von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen wurden. Der Backgroundwert entspricht der von vorneherein vorhandenen Radioaktivität in der Scintillationsflüssigkeit und im Meßgerät.

Zur Ermittlung des Endergebnisses wurden nur diejenigen Fälle verwendet, in denen die Zählhausbeute aller Versuchsansätze deutlich über dem Leerwert lagen. Das ist die Erklärung dafür, daß von 105 Versuchen nur insgesamt 65 zur Auswertung herangezogen werden konnten.

Die endgültigen Meßdaten entstanden durch Bildung des Mittelwertes aus den 3 jeweils zusammen unter völlig gleichen Bedingungen angesetzten Kulturen. Die in Tabelle 2 und 3 verzeichneten Meßdaten stellen also immer die Mittelwerte der Dreifachansätze dar.

IV. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden Blutproben von	30
gesunden Erwachsenen im Alter zwischen 22 und 32 Jahren	
und das Nabelschnurblut von	75
Neugeborenen der I. und II. Universitätsfrauenklinik München.	

Die Mütter der Neugeborenen ließen während der Schwangerschaft keine klinischen und - soweit untersucht - auch keine bakteriologischen Zeichen einer signifikanten Bakteriurie erkennen.

V. Bestimmung der Immunglobuline

Die Serumspiegel der Immunglobuline IgG, IgM und IgA wurden mit der Immundiffusionsmethode nach Mancini et al. (65) bestimmt, unter Benützung von Partigen^R Immundiffusionsplatten und standardisiertem Humanserum.

VI. Antikörpertiter-Bestimmung (passive Hämagglutination)

Die AK-Titer gegen ein E.coli-Mischantigen wurden mit der indirekten Hämagglutinationstechnik nach Neter et al. (73) ermittelt.

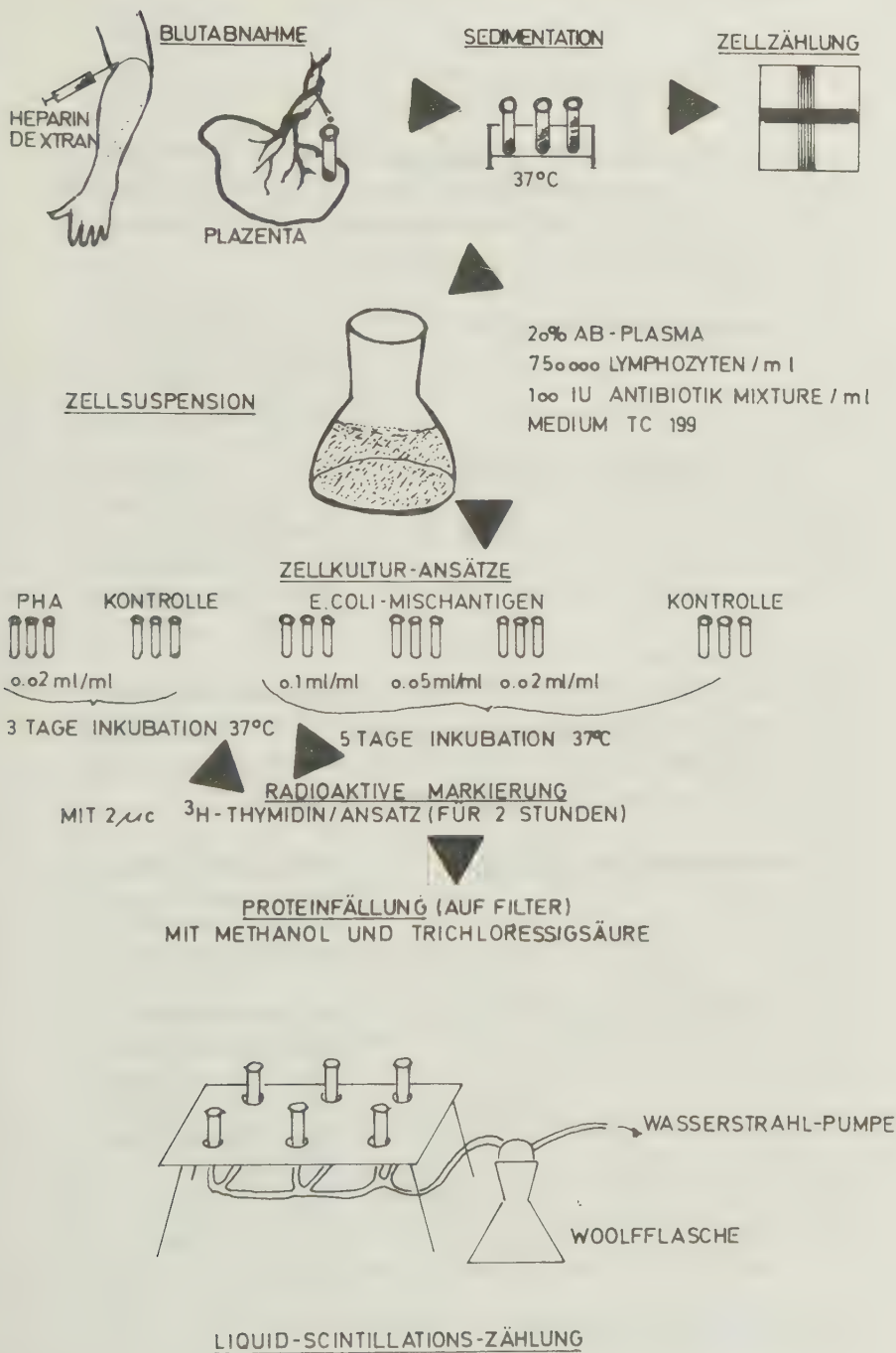
VII. Verwendetes Arbeitsmaterial

Heparin	Hoffmann- La Roche, Grenzach
Liquemin ^R	" "
Dextran 6%	Knoll AG., Ludwigshafen
Macrodex ^R	" "
TC Medium 199	Difco Labratories, Detroit, Michigan USA
No-Bicarbonat	
Trypanblau	EGA-Chemie AG., Kepler u.Reif, Steinheim/Albuch
Antibiotika	Antibiotic Mixture,Grand Island Biological Compagny, New York, USA, Controll-No.ooo32 A
Phytohäm- agglutinin	PHA P Difco, Difco Labraties, Detroit,Michigan USA Batch No.549 125 PHA Wellcome,Wellcome Reagenr.Ldt Beckenham,Kent,Engl. Lot No. K 1596
H3-Thymidin	Thymidin-6-H3,Radiochem.Center Amersham,England Batch No.127 Spezifische Aktivität 5,o Curie/ mmol 5,5 gr (91% PPO, 9% MSB)
Scintillations- flüssigkeit	5,5 gr. Permablend (91% PPO, 9% MSB) in 1 L Toluol
Immunodiffu- sionsplatten	Partigen ^R Behringwerke AG., Marburg/Lahn
E.coli- Mischantigen	Dieses Antigen wurde aus 8 verschie- denen Escherichia coli-Stämmen herge- stellt (E.coli o1, o2, o4, o6, o7, o8 o18, o75), die uns freundlicherweise von F.Ørskov, Kopenhagen, zur Verfügung gestellt worden waren.

Die Bakterienstämme wurden über Nacht kultiviert, am nächsten Tag in 0,9% Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 1 Stunde lang bei 100° C gekocht, um die Mikroorganismen abzutöten und 40 Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Suspension in einem Spektralphotometer (Colemann Junior - Modell Junior 6/20) auf eine optische Dichte von 0,06 bei einer Wellenlänge von 650 mμ eingestellt und anschließend gegen definierte Antiseren in verschiedenen Verdünnungen getestet. Die Verdünnung, mit der sich der höchste Titer ergab, wurde zu unseren Untersuchungen verwendet.

Filteranlage	Sartorius Vakuumanlage Fa.Sartorius, Göttingen
Filter	Sartorius Glasfieberfilter Nr. 13400 Fa.Sartorius, Göttingen
Scintillations- counter	Packard Tri-carb Scintillationscounter
Sterile Pipetten	
Zentrifugengläschen mit Papierstopfen	
Erlmeyerkolben	

ABB.2: DARSTELLUNG DER METHODE



E. E r g e b n i s s e

In der Gruppe der Erwachsenen waren 26 von insgesamt 30 Fällen auswertbar. Auf Tabelle 1 sind alle Meßdaten dieser Gruppe zusammengestellt. Sie können wie folgt aufgeschlüsselt werden:

<u>Untersuchungen mit PHA:</u>	18 Fälle auswertbar
	18 Fälle mit nachweisbarer Stimulation
	13 Fälle standardisiert

<u>Untersuchungen mit E.coli:</u>	16 Fälle auswertbar	1
	13 Fälle mit nachweisbarer Stimulation	
	15 Fälle standardisiert	
	3 Fälle keine Stimulation	

Tabelle 2 und 3 zeigen eine Zusammenstellung aller Meßdaten der Neugeborenenengruppe, in welcher 41 von insgesamt 75 Fällen ausgewertet werden konnten. Es folgt wieder die Aufschlüsselung der Fälle:

<u>Untersuchungen mit PHA:</u>	22 Fälle auswertbar
	22 Fälle mit nachweisbarer Stimulation
	19 Fälle standardisiert

<u>Untersuchungen mit E.coli:</u>	23 Fälle auswertbar
	23 Fälle standardisiert
	8 Fälle mit nachweisbarer Stimulation
	15 Fälle keine Stimulation

Tabelle 2

Zusammenstellung aller Meßdaten bei Erwachsenen

Fall	PHA cpm	K cpm	SI	Coli cpm	K cpm	SI	AK- Titer	IgG	IgM	IgA
1	3428	150	23	-	-	-	1:2560	820	96	10
2	1393	67	21	-	-	-	1:2560	690	99	30
4	2814	61	46	-	-	-	1:2560	690	99	30
6	1705	103	16,5	-	-	-	1:640	720	90	50
8	1700	63	27	-	-	-	1:2560	820	96	10
9	6929	48	144	-	-	-	1:2560	820	96	10
11	5331	25	213	-	-	-	1:640	870	102	25
14	1466	26	56	241	20	12	1:2560	690	99	30
15	2206	30	73,5	149	30	5	1:2560	820	96	10
22	35090	63	557	-	-	-	1:640	-	-	-
30	-	-	-	47	22	2	1:640	870	102	25
31	-	-	-	175	78	2,5	1:2560	690	99	30
36	-	-	-	340	49	7	1:2560	720	90	50
47	-	-	-	105	50	2	1:2560	690	99	30
56	1985	48	41	301	24	13	1:640	-	-	-
62	1534	89	17,5	1256	69	18	1:80	790	0	0
63	3592	60	60	27	30	1	1:2560	690	99	30
67	8978	35	256	192	170	1	1:2560	820	96	10
68	6625	36	184	400	60	6,5	1:640	870	102	25
73	-	-	-	441	21	21	1:2560	690	99	30
77	4457	47	95	-	-	-	1:640	870	102	25
84	1630	165	10	-	-	-	1:320	1230	109	50
79	-	-	-	178	62	3	1:80	790	85	20
85	8452	79	107	78	79	1	1:2560	820	96	10

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von
Tabelle 2

Fall	PHA cpm	K cpm	SI	Coli cpm	K cpm	SI	AK- Titer	IgG	IgM	IgA
94	-	-	-	79	35	2	1:160	890	85	58
97	-	-	-	191	54	4	1:640	890	117	20

PHA = Ergebnis der Stimulation mit PHA in cpm

K = Kontrollwerte in cpm (cpm in stimulierten Kulturen

SI = Stimulationsindex (cpm in Kontrollkulturen

cpm = counts per minute

IgG =)

IgM =) Immunglobulinspiegel

IgA =)

AK-Titer= Antikörpertiterwerte gegen E.coli-Mischantigen

Tabelle 3

Zusammenstellung aller Meßdaten bei Neugeborenen

Fall	PHA cpm	K cpm	SI	Coli cpm	K cpm	SI	AK- Titer	IgG	IgM	IgA
3	313	93	3	-	-	-	-	-	-	-
5	363	71	5	-	-	-	-	-	-	-
7	462	162	3	-	-	-	1:2560	-	-	-
10f	2699	361	7,5	-	-	-	1:80	590	20	∅
13m	1621	577	3	-	-	-	1:20	790	∅	∅
18f	1907	104	18	-	-	-	1:160	690	∅	∅
20f	14046	956	14,5	396	149	2,5	1:90	550	∅	∅
21m	-	-	-	324	95	3,5	1:20	490	∅	∅
23m	5831	324	18	61	70	1	1:80	930	∅	∅
24f	21240	1822	11,5	-	-	-	1:80	-	-	-
28f	23541	1138	20,5	-	-	-	1:169	690	∅	∅
35f	3702	1527	2,5	1273	500	2,5	1:80	740	∅	∅
37m	-	-	-	1	12	∅	1:160	1230	∅	∅
38m	-	-	-	9	5	∅	1:80	130	∅	∅
40f	-	-	-	3	5	∅	1:160	550	∅	∅
41m	-	-	-	60	24	2,5	1:20	780	∅	∅
42f	449	21	21	93	45	2	1:640	980	∅	∅
44f	342	30	11,5	-	-	-	1:80	910	∅	∅
45m	4778	48	99	-	-	-	1:160	760	∅	∅
46m	5158	24	215	-	-	-	1:80	780	∅	∅
48f	-	-	-	3	14	∅	1:320	840	∅	∅
50m	1514	14	108	123	46	3	1:40	1030	5	∅
51m	3807	43	88	57	49	1	1:20	630	∅	∅

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung von Tabelle 3

Fall	PHA	K	SI	Coli	K	SI	AK-Titer	IgG	IgM	IgA
—	cpm	cpm		cpm	cpm					
55m	878	121	7	58	45	1	1:20	700	∅	∅
61m	1175	217	5	880	1050	1	1:40	840	∅	∅
64f	—	—	—	20	19	1	1:20	590	5	∅
65m	—	—	—	65	33	2	1:20	1030	∅	∅
66m	—	—	—	31	106	1	1:20	590	7,5	∅
69m	5689	116	48	55	141	1	1:20	760	∅	∅
70f	—	—	—	71	62	1	1:80	480	∅	∅
71f	—	—	—	8	5	∅	1:10	540	∅	∅
72m	—	—	—	46	69	1	1:20	810	∅	∅
78m	—	—	—	415	54	7,5	1:40	760	∅	∅
82f	4840	288	16,5	—	—	—	1:10	600	∅	∅
83f	6840	424	16	—	—	—	1:10	840	∅	∅
90f	—	—	—	48	47	1	1:10	—	—	—
95f	—	—	—	67	57	1	1:10	—	—	—
96m	—	—	—	55	70	1	1:20	—	—	—
98f	—	—	—	56	50	1	1:20	—	—	—
99f	—	—	—	54	42	1	1:40	—	—	—
100m	—	—	—	44	43	1	1:80	—	—	—

f = feminin
 m = maskulin
 K = Kontrollwerte in cpm
 SI = Stimulationsindex
 AK-Titer = Antikörpertiter gegen E.coli-Mischantigen
 IgG)
 IgM) = Immunglobulinspiegel
 IgA)

1. Lymphozytenstimulation mit PHA in vitro
bei Erwachsenen

Der Durchschnittskontrollwert lag bei den 13 nach Standardisierung der Methode untersuchten Erwachsenen bei 66 counts per Minute (cpm). Nach Zugabe von PHA erhöhten sich die Werte auf einen Durchschnitt von 5513 cpm. In Abbildung 3 sind diese Durchschnittswerte zur besseren Veranschaulichung gegeneinander aufgetragen.

Bestimmt man den sogenannten Stimulationsindex, der sich aus dem Quotienten cpm in stimulierten Kulturen ergibt, cpm in Kontrollkulturen. so erhält man bei Erwachsenen einen Stimulationsindex von 85. Die Meßwerte waren nach Zugabe von PHA also durchschnittlich 85 mal höher als in Kontrollversuchen, die zum gleichen Zeitpunkt und unter denselben Bedingungen, aber ohne PHA, angesetzt worden waren. Das heißt, der Einbau an radioaktiv markiertem Thymidin und damit die DNA-Synthese stieg unter dem Einfluß von PHA durchschnittlich um das 85- fache.

Ein deutlicher Anstieg des Thymidineinbaus nach Zugabe von PHA war in allen Lymphozytenkulturen von Erwachsenen meßbar, wie aus Tabelle 2 hervorgeht. In Abbildung 4 sind alle Stimulationsindices noch einmal einzeln aufgeführt, um die Abweichungen vom Mittelwert aufzuzeigen.

ABB.3:

DURCHSCHNITTliche HÖHE DES EINBAUS VON ^3H -THYMIN IN LYMPHOZYTEN VON NEUGEBORENEN UND ERWACHSENEN NACH STIMULATION MIT PHA, GEMESSEN IN counts per minute (cpm). ZUM VERGLEICH DANE BEN DIE KONTROLLWERTE.

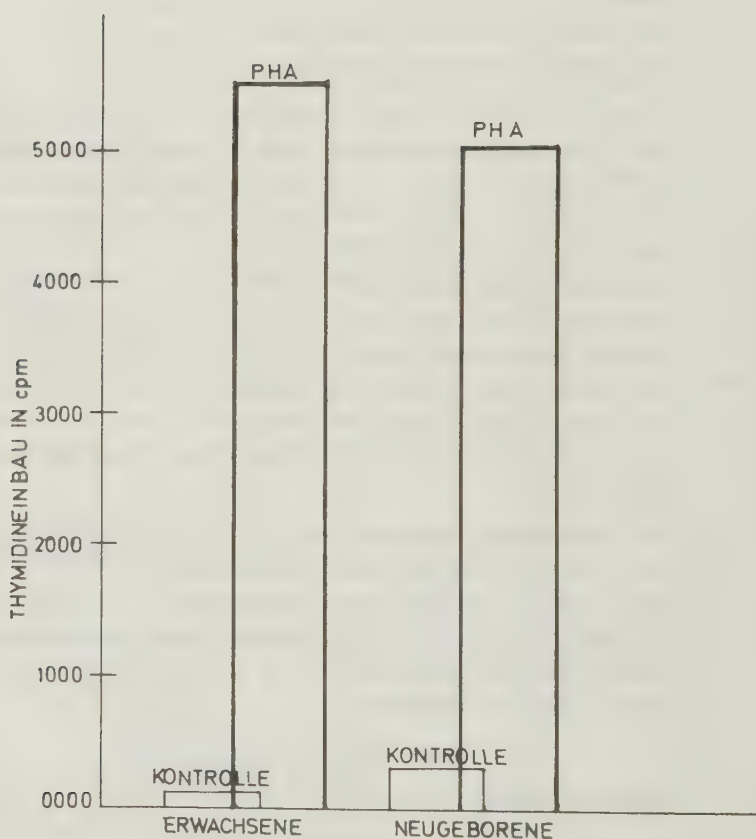
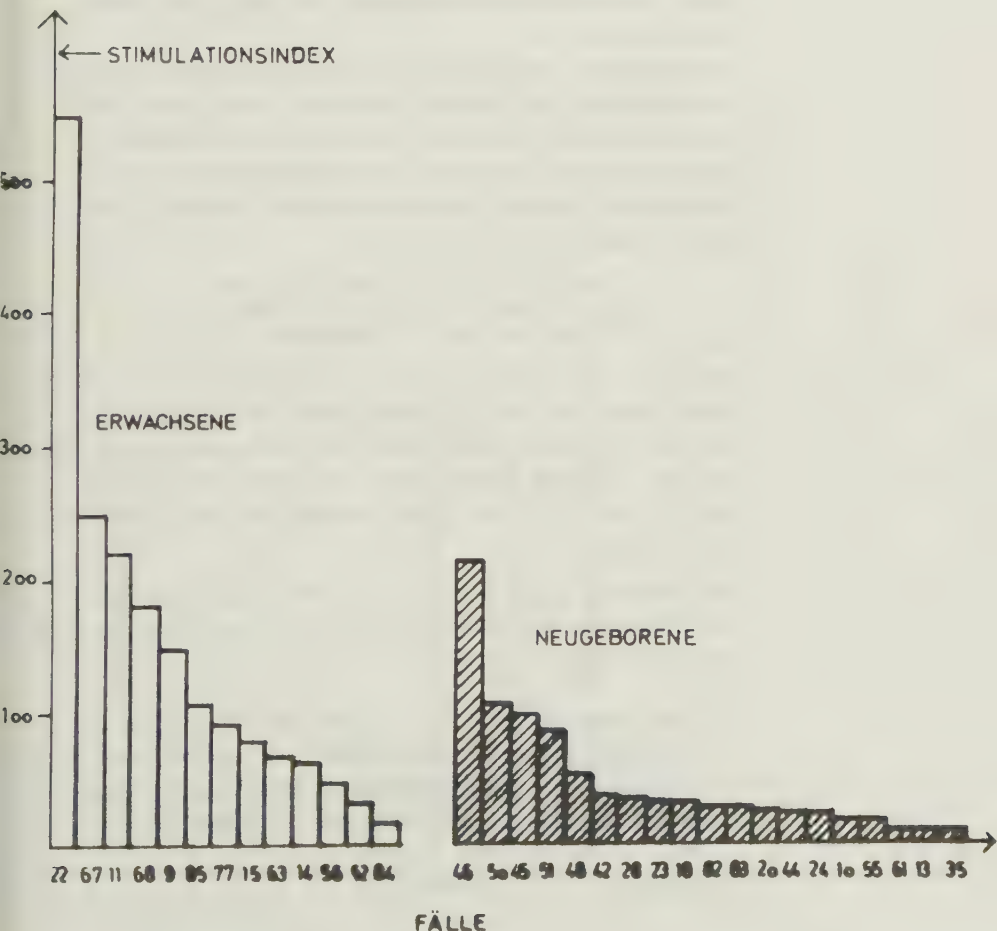


ABB. 4:

ERGEBNISSE DER STIMULATION MIT PHA, AUSGEDRÜCKT IN Stimulationsindices (SI). AUF DER ABSZISSE SIND DIE EINZELNEN FÄLLE, AUF DER ORDINATE DIE IHNEN ENTSPRECHENDEN STIMULATIONSINDICES AUFGETRAGEN. DIE ZAHLEN UNTER DEN SÄULEN BEZEICHNEN JEWELS DIE NUMMER DES FALLES.



2. Lymphozytenstimulation mit PHA bei Neugeborenen

Die Kontrollkulturen der 19, nach Standardisierung der Methode, untersuchten Fälle zeigten einen Durchschnittswert von 390 cpm. Nach Zugabe von PHA konnte in den Nabelschnurblutkulturen ein Anstieg des Durchschnittswertes auf 5049 cpm beobachtet werden.

Abbildung 3 zeigt diese Resultate, gegeneinander aufgetragen. Auf dieser Abbildung sind auch die entsprechenden Meßwerte der Erwachsenenengruppe eingezeichnet, sodaß ein Vergleich zwischen den Ergebnissen beider Versuchsgruppen möglich ist. Wird wieder der Quotient aus

$$\frac{\text{cpm in stimulierten Kulturen}}{\text{cpm in Kontrollkulturen}}$$

gebildet, so ergibt sich bei Neugeborenen ein Stimulationsindex von 13. Das heißt, der Thymidineinbau war in Kulturen mit PHA zusatzdurchschnittlich um das 13-fache gesteigert, ein sicherer Beweis dafür, daß in erheblichem Ausmaß DNA neu synthetisiert wurde.

Wie Tabelle 4 zeigt, war eine deutliche Antwort auf PHA auch bei Neugeborenen in allen untersuchten Fällen zu beobachten.

In Abbildung 4 sind alle Stimulationsindices der Neugeborenenengruppe neben denen der Erwachsenen einzeln aufgetragen, um einen übersichtlichen Vergleich zwischen beiden Versuchsgruppen zu ermöglichen.

ABB. 5:

DURCHSCHNITTliche HÖHE DES EINBAUS VON ^3H -THYMIN IN
LYMPHOZyTEN VON NEUGEBORENEN UND ERWACHSENEN
NACH STIMULATION MIT E.coli-MISCHANTIGEN GEMESSEN
IN counts per minute (cpm).
ZUM VERGLEICH DANE BEN DIE KONTROLLWERTE

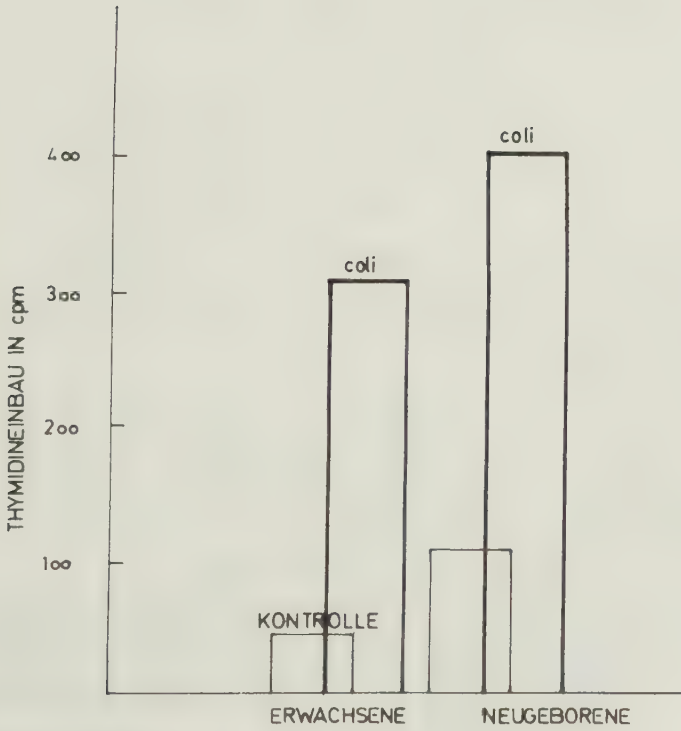
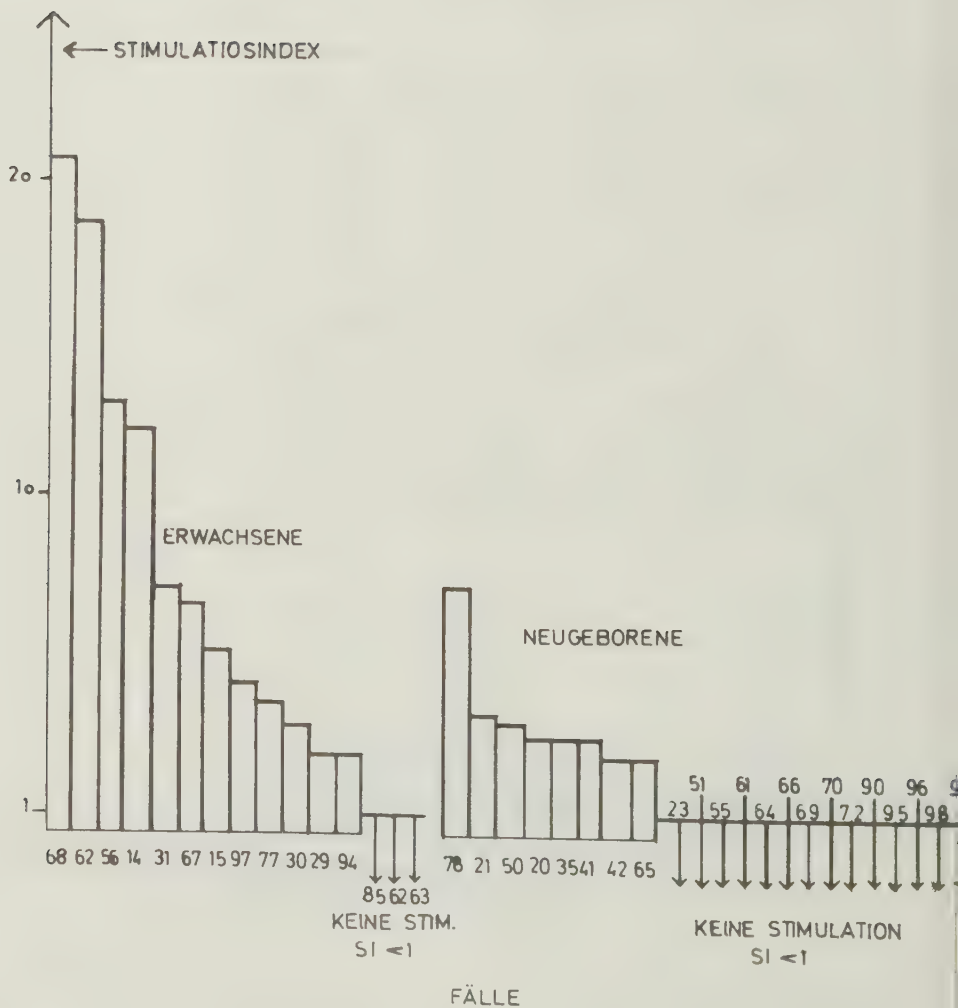


ABB. 6:

ERGEBNISSE DER STIMULATION MIT E.Coli-Mischantigen
 AUSGEDRÜCKT IN Stimulationsindices (SI).
 AUF DER ABSZISSE SIND DIE EINZELNEN FÄLLE AUF
 DER ORDINATE DIE IHNEN ENTSPRECHENDEN STIMU-
 LATIONSINDICES AUFGETRAGEN. DIE ZAHLEN UNTER DEN
 SÄULEN BEZEICHNEN JEWEILS DIE NUMMER DES FALLES.



3. Lymphozytenstimulation mit E.coli-Antigen in vitro bei Erwachsenen

Eine Inkubation von Erwachsenenlymphozyten mit E.coli-Antigen ergab einen durchschnittlichen Stimulationswert von 301 cpm. Die Kontrollen fielen mit einem Durchschnittswert von 43 cpm dagegen deutlich ab.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammen abgebildet, um zu verdeutlichen, wie groß auch bei Verwendung von E.coli-Antigen der Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Kulturen ist. Der durchschnittliche Stimulationsindex liegt hier aber mit 7 deutlich niedriger als in PHA-stimulierten Kulturen. Mit E.coli-Antigen ließ sich also die Einbaurrate von ³H-Thymidin nur um das 7-fache steigern, was bedeutet, daß zwar eine Neusynthese von DNA erfolgte, aber in weit geringerem Ausmaß als in PHA-stimulierten Kulturen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Verwendung von PHA konnte auch nicht in allen Fällen eine in vitro Antwort der Lymphozyten auf E.coli-Antigen erreicht werden.

Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, daß 3 von 15 Fällen auf E.coli-Antigen nicht mit einer Steigerung der DNA-Synthese antworteten. Der Stimulationsindex lag in diesen Fällen um 1 oder darunter.

4. Lymphocytenstimulation mit E.coli-Antigen bei Neugeborenen

Bei Verwendung des spezifischen E.coli-Antigens reagierten 8 von 23 Neugeborenen mit einem Anstieg der Einbaurate von radioaktiv markiertem Thymidin. Die übrigen zeigten keinerlei Veränderung der Synthese-Aktivität.

Wie Abbildung 7 zeigt, war bei Erwachsenen der Prozentsatz der Fälle, in denen sich auf E.coli-Antigen keine in vitro Antwort der Lymphozyten nachweisen ließ, wesentlich geringer.

Diejenigen Nabelschnurblutkulturen, welche auf Zusatz von E.coli-Antigen reagierten, erbrachten einen durchschnittlichen Stimulationswert von 403 cpm. Die dazugehörigen Kontrollwerte lagen bei 110 cpm.

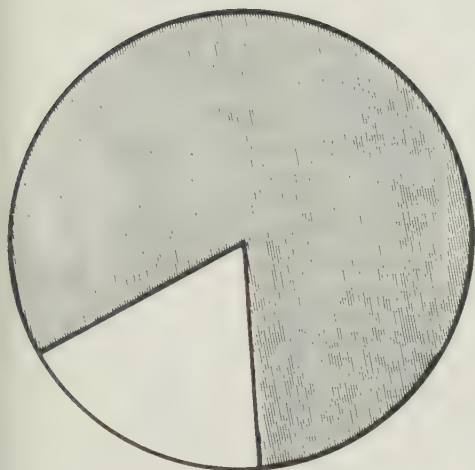
Auf Abbildung 5 sind diese Meßwerte zum Vergleich neben den Ergebnissen der Erwachsenen abgebildet.

Der durchschnittliche Stimulationsindex lag hier mit 3,5 ebenfalls niedriger, als wenn PHA zur Stimulation verwendet wurde.

In Abbildung 6 sind die Stimulationsindices bei E.coli-Stimulation einzeln aufgetragen. Sie zeigen, daß auch bei Verwendung eines spezifischen Antigens ein Unterschied zwischen der Aktivität von Erwachsenen- und Nabelschnurlymphozyten besteht.

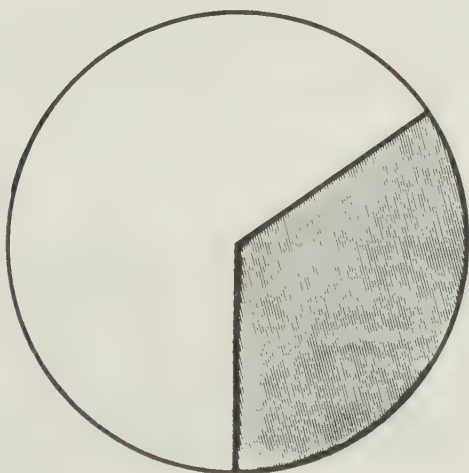
ABB.7:

PROZENTSATZ DER MIT E-coli-ANTIGEN STIMULIERBAREN FÄLLE (DUNKEL SCHRAFFIERTES FELD) IM VERHÄLTNIS ZUR GESAMTZAHL ALLER UNTERSUCHTEN FÄLLE.



ERWACHSENE

NEUGEBORENE



5. Spontanstimulation

Ein besonders interessantes Ergebnis bringt ein Vergleich der Kontrollkulturen.

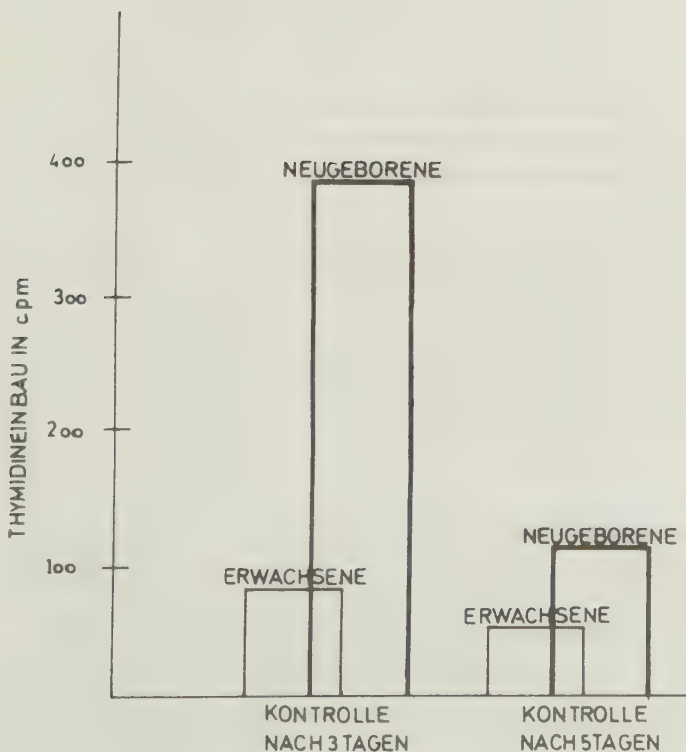
Abbildung 8 zeigt die Durchschnittswerte in den Kontrollkulturen der Nabelschnurlymphozyten in der Gegenüberstellung zu den Durchschnittswerten der Kontrollkulturen der Erwachsenen. Sowohl nach 3, als auch nach 5 Tagen zeigten die Lymphozyten der Neugeborenen eine deutlich stärkere Spontanaktivität als die der Erwachsenen.

6. Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgM und IgA

Die Ergebnisse der Immunglobulinbestimmung sind in Tabelle 2 und 3 zusammen mit den übrigen Meßdaten unter dem dazugehörigen Fall aufgeführt. Es fand sich keinerlei Zusammenhang mit den Ergebnissen der Lymphozytenstimulation.

ABB. 8:

HÖHE DER SPONTANSTIMULATION BEI ERWACHSENEN UND NEUGEBORENEN, JEWEILS NACH 3 UND 5 TAGEN KULTURDAUER, GEMESSEN IN counts per minute (cpm).



7. Antikörpertiterbestimmung gegen E.coli-Mischantigen

Von allen Neugeborenen und Erwachsenen, deren Lymphozyten untersucht worden waren, bestimmten wir die Antikörpertiter gegen das von uns verwendete E.coli-Mischantigen. Die Ergebnisse dieser Antikörperbestimmung sind in den Tabellen 2- und 3 mit den anderen Meßdaten zusammen aufgeführt. Sie werden in Tabelle 4 und 5 weiter aufgeschlüsselt.

Tab.4: Antikörper-Titerwerte bei Neugeborenen

<u>Anzahl d.Fälle</u>	<u>AK-Titer</u>
5	1:10
12	1:20
4	1:40
9	1:80
5	1:160
1	1:320
1	1:640
1	1:2560

Tab.5: Antikörper-Titerwerte bei Erwachsenen

<u>Anzahl d.Fälle</u>	<u>AK-Titer</u>
2	1:80
2	1:160
1	1:320
8	1:640
15	1:2560

Von großem Interesse sind die hohen Antikörpertiterwerte von 3 Kindern (Fall 3, 42 und 48), die den Werten entsprechen, die sonst nur bei Erwachsenen zu finden waren. Überraschenderweise ergab sich aber weder in diesen Fällen noch insgesamt irgend ein Zusammenhang der Antikörpertiter mit den Ergebnissen der Lymphozytenstimulation durch E.coli-Mischantigen oder PHA.

F. Diskussion

Unsere Ergebnisse bei der Stimulation mit PHA stimmen mit den Beobachtungen anderer Autoren insoweit überein, als sich mit PHA in allen untersuchten Fällen, sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Neugeborenen, ein deutlicher Anstieg der DNA-Synthese erzielen ließ.

In beiden Gruppen mußten wir jedoch eine starke Streuung der Meßwerte und der daraus errechneten Stimulationsindizes feststellen; bei den Neugeborenen allerdings ausgeprägter als bei den Erwachsenen. (Tab. 2 + 3).

Prindull (86), der von ähnlichen Schwankungen bei seinen Versuchen berichtete, vermutet ihre Ursache in einem wechselnden Anteil der T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der zirkulierenden weißen Zellen.

In der Gruppe der erwachsenen Kontrollpersonen lag der Stimulationsindex bei einem Durchschnittswert von 85; in der Neugeborenenengruppe bei einem Durchschnitt von 13, das heißt, in Kulturen von Erwachsenenlymphozyten steigerte sich die DNA-Synthese nach Zugabe von PHA durchschnittlich um das 85-fache, während unter gleichen Versuchsbedingungen bei Nabelschnurlymphozyten nur eine durchschnittliche Steigerung um das 13-fache eintrat. Selbst wenn man die starken Abweichungen vom Durchschnittswert in beiden Gruppen berücksichtigt, kann man aus diesen Ergebnissen schließen, daß die Fähigkeit zur Transformation bei Nabelschnurlymphozyten weniger stark ausgeprägt ist.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Elves et al. (34) überein, die nach der Stimulation mit PHA bei Neugeborenen eine geringere Anzahl von transformierten Zellen sahen als bei Erwachsenen. Auch Burgio et al. (13) und Colombies et al. (23) fanden ebenfalls eine verminderte Transformationsrate in ihren Lymphozytenkulturen, wenn sie Neugeborenenlymphozyten untersuchten.

Bei der Spontantransformation von Kontrollkulturen ohne

Antigenzusatz fanden sich jedoch gegenüber den Ergebnissen der PHA-Stimulation eher umgekehrte Relationen. Mit 390 cpm gegenüber 66 cpm ist hier der durchschnittliche Thymidineinbau der Neugeborenenlymphozyten deutlich höher als der bei Erwachsenenlymphozyten. Diese Resultate entsprechen den Ergebnissen anderer Autoren. Pulvertaft et al. (87) fanden unter 100 Erwachsenen nur einen Fall mit spontaner Transformation der Lymphozyten in Blasten, während alle von ihm untersuchten Nabelschnurblutkulturen nach 3 Tagen einen hohen Prozentsatz (bis 100 %) transformierte Lymphozyten enthielten. Kay et al. (53), Wilson (99) und Papiernik m. Nezeloff (83) berichten ebenfalls von hohen Spontantransformationsraten in Kulturen von Neugeborenenlymphozyten.

Der gesteigerten Einbauquote an 3H-Thymidin in unseren Kontrollkulturen entspricht demnach eine starke Neigung der Neugeborenenlymphozyten zu spontaner Transformation.

Eine Ursache dafür könnte die verkürzte Generationszeit mit vermehrter Proliferation der Zellen im Neugeborenenalter sein (Prindull, 86).

Die stärkere Spontanstimulation der Nabelschnurlymphozyten wäre dann nur Ausdruck einer unspezifischen Erhöhung der Stoffwechsellaage.

Andererseits kann es, nach Ansicht einiger Autoren, Desai et al. (29), Grouchy et al. (43), Oehme et al. (76,78), Olding (79), Kadowaki et al. (51), während der Geburt zu einem materno-foetalen Lymphozytenübertritt kommen.

Die Häufigkeit materno-foetaler Transfusionen war lange Zeit umstritten. Die Untersuchungen von betke u. Sanquansermisri (108) haben diese Frage bezüglich des Übertritts von Erythrozyten inzwischen geklärt. Sie fanden bei 49 von 152 Neugeborenen mütterliches

Hämoglobin.

Die hohe Spontantransformation in diesen Fällen wäre dann möglicherweise das Ergebnis einer Stimulation durch die mütterlichen Lymphozyten. Allerdings sind die Ansichten darüber, ob eine Mischung von Nabelschnurlymphozyten und mütterlichen Zellen überhaupt zu einer Transformation im Sinne eines "mixed-culture" Effekts führen kann, recht geteilt.

Debray-Sachs et al. (28) fanden zwar in solchen Mutter/Kind-Mischkulturen eine deutliche Transformation, doch Walknowska et al. (98) konnten dagegen in keinem Fall einen Anstieg der Mitoserate erzielen, was sie auf den hohen Verwandtschaftsgrad zwischen Mutter und Kind zurückführten.

Wenn man unsere Vermutung zu Grunde legt, daß die hohe Spontanstimulation bei Neugeborenen möglicherweise das Ergebnis einer Mischung von kindlichen und mütterlichen Zellen ist, so wäre in unserem Untersuchungsgut in 15 von 20 Fällen ein transplazentarer Übertritt mütterlicher Leukozyten erfolgt.

Mit. *E. coli* ließ sich bei den meisten Erwachsenen und einigen Neugeborenen ebenfalls eine deutliche Steigerung der DNA-Synthese erzielen. Sie ist allgemein weniger stark ausgeprägt als bei Verwendung von PHA.

So wurde bei Erwachsenen durch PHA der Einbau von 3H-Thymidin im Durchschnitt auf das 85-fache erhöht; durch *E. coli* nur auf das 7,5 -fache. Ähnlich war es bei der Gruppe der Neugeborenen. Mit PHA betrug die Steigerung hier das 13-fache, mit *E. coli* nur das 3,5 -fache. Diese quantitativen Unterschiede scheinen aber immer bei Verwendung spezifischer Antigene aufzutreten (16,33,27,46,62,80,81) und werden mit der Burnet'schen Clontheorie erklärt.

Wie schon bei Verwendung von PHA zeigt sich auch bei Verwendung von *E. coli*-Antigen ein deutlicher, quantitativer Unterschied zwischen der Reaktion von

Neugeborenen- und Erwachsenenlymphozyten. Bei Neugeborenen - sofern sich überhaupt ein Stimulations-effekt nachweisen ließ - war die DNA-Synthese weniger stark erhöht. Zu diesem Ergebnis kamen auch Brody et al. (72).

Ein weiterer Unterschied ergab sich hinsichtlich des Prozentsatzes der Fälle, in denen eine Stimulation durch E.coli überhaupt möglich war (Abb.7). Da wir Nabelschnurblut verwendet hatten, war es keineswegs überraschend, daß nur wenige Neugeborene deutlich positiv auf E.coli reagierten, weil zum Zeitpunkt der Geburt ein Kontakt mit diesem Keim normalerweise noch nicht stattgefunden hat. Wir wissen jedoch nicht, warum die Lymphozyten von 3 Erwachsenen ebenfalls keine Reaktion zeigten, da eine Sensibilisierung bei der weiten Verbreitung von E.coli eigentlich vorausgesetzt werden dürfte.

Ling + Husband (61) konnten ebenfalls nur bei 75 % der von ihnen untersuchten Erwachsenen ein positives Stimulationsergebnis erzielen. Trotzdem können wir nicht ausschließen, daß möglicherweise die optimale Antigenosis, die von Fall zu Fall variieren kann (7,62,89) nicht erreicht wurde. Eventuell könnte in diesen Fällen das von uns verwandte Coli-Antigen auch toxisch auf die Lymphozyten gewirkt haben (7,8,9,46, 81).

Wichtigstes Ergebnis unserer Untersuchungen ist schließlich die Tatsache, daß von 23 Neugeborenen 8 eine deutliche Reaktion auf E.coli-Mischantigen zeigten, obwohl in dieser Altersgruppe eine spezifische Sensibilisierung noch nicht zu erwarten war.

Es bieten sich folgende Erklärungen an:

1. Nach Ansicht von Leikin et al. (57,58) muß die Möglichkeit einer pränatalen Sensibilisierung erwogen werden. Eine intrauterine Infektion, ausgelöst durch die Übertragung des Antigens von der erkrankten Mutter

auf das Kind, führt - dieser Theorie zufolge - nicht zu einer Antigentoleranz, sondern zu einer Immunantwort des Foeten und zur Ausbildung immun-kompetenter Lymphozyten, die sich in vitro mit dem betreffenden Antigen zu einer Transformation stimulieren lassen.

Brody et al. (12) führten bei 16 Neugeborenen, deren Mütter unter Schwangerschafts-pyelitis mit nachweisbarer Bakteriurie gelitten hatten, einen Lymphozyten-transformationstest mit E.coli-Antigen durch und erhielten in allen Fällen positive Resultate. In der Kontrollgruppe, bestehend aus 11 Neugeborenen von gesunden Müttern, befanden sich nur 2 Fälle, die auf E.coli mit Ausbildung von Blasten reagierten. In Versuchen mit Ratten konnte Gill (39) die Übertragung eines künstlichen Antigens sogar bis in die Enkelgeneration verfolgen. Ohne weitere Sensibilisierung ließ sich von ihm bei den neugeborenen Ratten eine sekundäre Immunantwort gegen das künstliche Antigen erreichen.

Für unsere Untersuchungsergebnisse würde dies bedeuten, daß in den 8 Fällen, bei denen der Transformationstest positiv ausfiel, eine E.coli-Infektion der Mutter stattgefunden hat, auch wenn die Schwangerschaftsanamnese keinerlei Hinweis auf eine bakterielle Erkrankung des Urogenital-Traktes erbrachte.

Im Untersuchungsgut von Leikin et al. (57) und Brody et al. (11,12) fanden sich ebenfalls solche Fälle, wo ein Widerspruch bestand zwischen der Aktivität der Nabelschnurlymphozyten in vitro und der negativen Schwangerschaftsanamnese. Das legt die Vermutung nahe, daß E.coli-Infektionen im Uro-Genital-Bereich während der Schwangerschaft in Wirklichkeit wesentlich häufiger vorkommen, als in den Anamnesen vermerkt ist. Möglicherweise verursachen sie so gering-

fällige Symptome, daß sie von den betroffenen Frauen und den behandelnden Ärzten häufig übersehen werden.

2. Es besteht die Möglichkeit, daß immunkompetente mütterliche Zellen in den kindlichen Kreislauf über-treten, die dann in vitro ihrer Sensibilisierung entsprechend auf E.coli-Antigen entweder selbst reagieren oder ihre Immunkompetenten auf die Neugeborenenlymphozyten übertragen.

Diesbezügliche Fragen sind zum Teil schon bei den Erörterungen zur Spontanstimulation angeschnitten worden. Es kann zwar nicht mehr bezweifelt werden, daß ein transplazenter Übertritt von mütterlichen Lymphozyten möglich ist (Grouchy (43), Desai + Creger (29), Walknowska et al. (98), Hathaway et al. (44), Olding (79) Oehme et al. (76,78), Betke K. + Sanguanserm Sri (108), aber ihr Schicksal im kindlichen Organismus ist noch weitgehend ungeklärt.

Bisher konnte nicht sicher nachgewiesen werden, daß eine Aussiedlung der fremden Zellen erfolgt. Vielmehr muß angenommen werden, daß der Foetus die eingedrungenen Fremdzellen zerstört (Kay et al. (52), Oehme (78).

In letzter Zeit wurden von einigen Autoren Fälle mit angeblicher "Runt-Disease" publiziert, die als Folge von Austauschtransfusionen bei Kindern mit Immundefekten aufgetreten sein sollen, deren geschwächte Abwehrkräfte nicht imstande waren, die fremden Zellen zu vernichten (Hathaway et al. (44), Kadowaki et al. (51) Naiman et al. (72).

Wenn sich diese Beobachtungen als stichhaltig herausstellen sollten, beweisen sie freilich nur, daß ein Chimärismus, d.h. das Nebeneinander zweier Lymphozytenpopulationen, normalerweise eben nicht vorkommt und daß der kindliche Immunapparat eingedrungene mütterliche Zellen sofort wieder eliminiert.

Eine "Runt Disease" als Folge materno-foetaler Passage von Lymphozyten konnte bis jetzt beim Menschen jedenfalls noch nicht beobachtet werden. Das spricht gegen die von Burnet (14) entwickelte These, daß ein pränataler Antigenkontakt zur Immuntoleranz gegen dieses Antigen führt, sofern es nicht einfach daran liegt, daß die Zahl der übergetretenen Zellen zu gering ist, um eine Toleranz zu erzeugen, wie Oehme (78) meint.

Es ist möglich, daß die mütterlichen Zellen ihre Immunkompetenz auf die kindlichen Lymphozyten übertragen. Antigen aktivierte Lymphozyten scheiden nämlich nach Meinung von Dumonde et al. (32) und Maini et al. (64) einen löslichen Faktor aus, der andere Lymphozyten stimuliert und an diese die Fähigkeit zu einer Sekundärreaktion weitergeben kann. Auf diese Weise könnten die mütterlichen Zellen vor ihrer Vernichtung für eine Übertragung ihrer Sensibilisierung sorgen.

Ein Argument gegen die Theorie, daß die Passage von Lymphozyten der Mutter eine entscheidende Rolle für die in vitro Reaktion gegen spezifische Antigene spielt, sind allerdings die Untersuchungen von Leikin et al. (57,58). Sie konnten in Nabelschnurblutkulturen mit *E.coli* eine Transformation erreichen, obwohl gleichzeitig durchgeführte Chromosomenanalysen keinen Hinweis für das Vorhandensein mütterlicher Lymphozyten ergaben.

3. Die spezielle zelluläre Immunität könnte schließlich auch auf einem anderen Wege auf das Kind übertragen werden. Lawrence (56) konnte nachweisen, daß zur Übertragung einer Überempfindlichkeit vom ver-

späteten Typ keineswegs nur lebende Lymphozyten fähig sind. Extrakte aus Lymphozyten, die durch Einfrieren, wiederholtes Erhitzen und durch Behandlung mit Dèsoxyrobonuklease abgetötet wurden, waren dazu ebenfalls imstande.

In diesen Extrakten sind niedermolekulare Lymphozytenbruchstücke erhalten, deren chemische Natur bis jetzt noch nicht völlig geklärt ist und die für die Übertragung verantwortlich sein sollen. Sie werden nach ihrem Entdecker Lawrence 'Transfer-Faktor' genannt. Der Mechanismus, durch den dieser Faktor befähigt ist, die Empfängerlymphozyten so zu verändern, daß sie eine sekundäre Immunantwort gegen ein Antigen zeigen, mit dem sie noch nie vorher in Kontakt gewesen waren, ist bis jetzt ebenfalls noch unbekannt (89,91,104).

Die Überschreitung der Plazentarschranke ist für den Transfer-Faktor natürlich wesentlich einfacher als für unbeschädigte Zellen. Autoren wie Field + Caspary (36,37) halten deshalb diesen Weg der Übertragung zellulärer Immunität von der Mutter auf das Kind für sehr wahrscheinlich. Damit ließe sich auch erklären, weshalb Leikin et al. (57) keine mütterlichen Zellen finden konnte.

Andererseits bleibt die Frage offen, weshalb dieser Faktor dann nicht immer, sondern nur in einem kleinen Teil der Fälle, übertragen wird. Auch der von Brody et al. (12) nachgewiesene Zusammenhang mit infektiösen Erkrankungen der Mutter während der Schwangerschaft kann mit dieser Theorie vorläufig noch nicht geklärt werden.

Der Versuch, eine direkte Beziehung zwischen zellulärer und humoraler Abwehr herzustellen, scheiterte erwartungsgemäß, da sich keinerlei Zusammenhang zwischen Antikörpertiterwerten gegen E.coli-Antigen und

den Ergebnissen der Stimulation mit PHA oder E.coli-Mischantigen nachweisen ließ. So konnte z.B. in den Fällen 48,63,67 und 84 (siehe Tab. 2 und 3) trotz hoher Titerwerte gegen E.coli keine in vitro Antwort auf dieses Antigen gefunden werden, während in Fall 62 (siehe Tab.2) nach E.coli-Stimulation eine besonders hohe Steigerung der DNA-Synthese eintrat, obwohl der Antikörpertiterwert mit 1:80 der niedrigste war, der bei Erwachsenen überhaupt gemessen wurde.

Die Immunglobulinspiegel ließen sich ebenfalls in keinen Zusammenhang mit den Ergebnissen der Lymphozytenstimulation bringen.

Zu ähnlichen Resultaten gelangten auch Brody + Oski (11), die Mitoseraten ihrer Lymphozytenkulturen mit den Immunglobulinspiegeln verglichen und keine Übereinstimmung finden konnten.

Für die Lösung aller im Zusammenhang mit unserer Arbeit aufgetauchten Fragen sind die bisherigen Kenntnisse über die Ursachen der spezifischen zellulären Immunität, die bei einem Teil der Neugeborenen durch in vitro Tests mit E.coli-Antigen nachgewiesen werden konnten, aber noch keineswegs ausreichend.

Hier werden in Zukunft weitere Untersuchungen erforderlich sein.

G. Zusammenfassung

Vom Nabelschnurblut gesunder Neugeborener und Venenblut gesunder Erwachsener wurden Lymphozytenkulturen angelegt, die mit PHA oder E.coli-Mischantigen versetzt und mit Kontrollkulturen ohne solche Zusätze verglichen wurden.

Als Beweis für eine Lymphozytenstimulation galt der vermehrte Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die neugebildete DNA der Lymphozyten.

Zur Auswertung verwendeten wir die Liquid-Scintillationsmethode. Bei Erwachsenen und Neugeborenen waren nach Zugabe von PHA eine deutliche Erhöhung der DNA-Synthese in den Lymphozytenkulturen meßbar.

Die Nabelschnurlymphozyten der Neugeborenen unterschieden sich durch eine quantitativ schwächere Reaktion auf PHA und ihre hohe Spontantransformation von den Erwachsenenlymphozyten.

Bei Verwendung von E.coli-Antigen zeigten bis auf 3 Ausnahmen alle Lymphozytenkulturen von 15 Erwachsenen eine deutliche Reaktion. Überraschenderweise ließen sich mit E.coli-Antigen die Lymphozyten von 8 von 23 Neugeborenen ebenfalls stimulieren. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist noch nicht völlig geklärt.

Es wäre möglich, daß während der Schwangerschaft die zelluläre Immunkompetenz der Mutter auf das Kind übertragen werden kann, entweder durch den transplazentaren Übertritt mütterlicher Lymphozyten oder durch Vermittlung des Lawrence-Transfer-Faktors. Andererseits kann ein intrauteriner Antigenkontakt mit nachfolgender pränataler Sensibilisierung des Foeten trotz fehlender Hinweise auf eine bakterielle Erkrankung der Mutter nicht ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen E.coli-Antikörpertiterwerten, Immunglobulinspiegel und Ergebnis des Transformationstests konnte nicht gefunden werden.

L i t e r a t u r n a c h w e i s

1. Astaldi, G., R. Airo, T. Lisino, E. Rodriques-Paradisi and E. Nowell: Antibodies to phytohemagglutinin. *Lancet* 2, 503 (1966)
2. Bach, F. and K. Hirschhorn: Gamma globulin production by human lymphocytes in vitro. *Exp. Cell. Res.* 32, 592 (1963)
3. Bach, M., S. Solliday, M. Sambuk and F. H. Bach: Revised mixed leucocyte culture test. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.* 15, 226 (1970)
4. Bain, B. and L. Löwenstein: Genetic studies on the mixed leucocyte reaction. *Science* 145, 1315 (1964)
5. Balassanian, N. and E. Wolinsky: Epidemiologic and serologic studies of *E. coli* O4:H5 in a premature nursery. *Pediatrics* 41, 463 (1968)
6. Billingham, R. E., V. Defende, W. K. Silvers and D. Steinmüller: Quantitative studies on the induction of tolerance of skin homografts and on runt disease in neonatal rats. *J. Nat. Cancer Inst.* 28, 365 (1962)
7. Britton, S.: Regulation of antibody synthesis against *Escherichia coli* endotoxin; Specificity, dose requirements and duration of paralysis induced in adult mice. *Immunology* 16, 513 (1969)
8. Britton, S.: Regulation of antibody synthesis against *Escherichia coli* endotoxin; III Induction of immunological paralysis in non-immune and pre-immunized mice. *Immunology* 16, 527 (1969)
9. Britton, S.: Regulation of antibody synthesis against *Escherichia coli* endotoxin; IV Induction of paralysis in vitro by treating normal lymphoid cells with antigen. *J. Exp. Med.* 129, 469 (1969)
10. Brown, R. S., H. A. Haynes, H. T. Foley, H. A. Godwin, G. W. Berard and P. P. Carbone: Hodgkin's disease. Immunological, clinical and histological features of 50 untreated patients. *Ann. intern. Med.* 67, 291 (1967)
11. Brody, J. I. and F. Oski: Immunologic memory of the normal and the leukaemic lymphocyte. *Ann. Intern. Med.* 7, 573 (1967)
12. Brody, J. I. and E. E. Wallach: Neonatal lymphocyte reactivity as an indicator of intrauterine bacterial contact. *Lancet* 1, 1396 (1968)

13. Burgio, G.R., G.B.Biscatti, L.Rizzoni, G.Genova and F.Severi: Phytohämagglutinin - Haut-Test und zugleich eine Untersuchung betreffs Alter, Hautreaktionsfähigkeit und Lymphozytenaktivierung. *Mschr.Kinderheilk.* 118,267 (1970)
14. Burnet, E.M.: The clonal selection theory of aquired immunity, New York, Cambridge University Press (1959)
15. Campbell, D. and J.Garwey: Nature of retained antigens and it's role in immune mechanisms. *Advanc.Immunol.* 3,261 (1963)
16. Caron, G.A.: Lymphocyte transformation induced by different doses of tuberculin as measured by tritiated thymidin uptake *Intern.Arch. Allergy Appl.Immunol.* 30,331 (1966)
17. Caron, G.A., H.S.Williams, I.Sarkany, A.P.Todd and H.M.C.Gell: Radioactive method for the measurement of lymphocyte transformation in vitro. *Lancet* 2,1266 (1965)
18. Carstairs, K.: Transformation of the small lymphocyte in culture. *Lancet* 2,984 (1961)
19. Craddock, D.G., R.Longmire and R.McMillan: Lymphocytes and the immune response. *New.Engl.J.Med.* 285,379 (1971)
20. Cole, G.J. and B.Morris: The normal Lymphocyte transfer reaction in lambs thymectomized in utero. *Aust.J.exp.Biol.med.Sci.* 49,89(1971)
21. Cole, G.J. and B.Morris: Homograft rejection and hypersensitivity reaction in lambs thymectomized in utero. *Aust.J.Exp.Biol.med.Sci.* 49,75 (1971)
22. Cole, G.J. and B.Morris: The Cellular and humoral response to antigens in lambs thymectomized in utero. *Aust.J.Exp.Biol.med.Sci.* 49,55 (1971)
23. Colombies P., J.Ducos, E.Ohayon et F.Kessons: Etudes de la reaktivité a la phytohemagglutinine des lymphocytes de nouveau-nés. *Ann.Inst.Pasteur* 117,868 (1969)
24. Cooper, L. and A.D.Rubin: RNA Metabolism in lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin: Initial responses to phytohaemagglutinin. *Lancet* 2,723 (1965)
25. Cooper, L. and A.D.Rubin: Lymphocyte R.N.A. metabolism. *Lancet* 2,91 (1963)
26. Cowling, D.C., D. Quaglino and E.Davidson: Changes induced by tuberculin in lymphocyte cultures. *Lancet* 2,1091 (1963)

27. Cowling, D.C. and D.Quaglino: Effekt of some antigens on leucocyte cultures.
J.Path.Bact. 89,63, (1965)
28. Debray-Sachs, M., J.F.Bach and J.Dormont: Transformation des lymphocytes du nouveau-né avec les lymphocytes de la mère.
Ann.Inst.Pasteur 117,862 (1969)
29. Desai, R.G. and W.P.Creger: Maternofetal passage of leucocytes and platelets in man. Blood 21,665 (1963)
30. Dirks, R.E. and C.C.Shephard: Effect of Phytohaemagglutinin and various mycobacterial antigens on lymphocyte cultures from leprosy patients. Proc.Soc.exp.Biol.127,391 (1968)
31. Doniach, I. and S.R.Pelc: Autoradiograph technic. Brit.J.Radiol. 23,184 (1950)
32. Dumonde, D.C., R.A.Wolstencroft, G.S.Panayi, M! Matthew, J.Morley and W.T.Howson: "Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. Nature 224,38 (1969)
33. Elves, M.W., S.Roath and M.C.G.Israels: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. Lancet 1,806 (1963)
34. Elves, M.W., S.Roath and M.C.G.Israels: Failure of lymphocytes from hypogammaglobulinaemic subjects to transform in culture. Brit.med. J. 2,1051 (1964)
35. Epstein, L.B. and F.Stohlman jr.: RNA synthesis in cultures of normal human peripheral blood. Blood 24,69 (1964)
36. Field E.F. and E.A.Caspary: Inhibition of lymphocyte response by serum. Lancet 2,95 (1971)
37. Field, E.F. and E.A.Caspary: Is maternal lymphocyte sensitisation passed to the child? Lancet 2,337 (1971)
38. Fürth, R. van, H.R.E.Schuit and W.Hijmanns: The immunological development of the human fetus J.exp.Med. 122,1173 (1965)
39. Gill, T.J.: Is maternal lymphocyte sensitisation passed to the child? Lancet 2,824 (1971)
40. Golub, E.S. and W.O.Weigle: Studies on the induction of immunologic unresponsiveness (Effect of endotoxin and phytohaemagglutinin) J.Immunol. 98,1241 (1967)
41. Gowans, J.L. and D.D.McGregor: The immunologic activities of lymphocytes. Prog.Allergy 9,78 (1965)

42. Gropp, A. und R.Lischer/ Untersuchungen zur
Phytohämagglutinin stimulierten Umwand-
lung von menschlichen Blutlymphozyten
zu blastenartigen Zellen.
Virchows Arch.path.Anat.338,64 (1964)
43. Grouchy de, J. and C.Trebuchet: Transfusion
foeto-maternelle de lymphocytes sanguins
et detection du sexe du foetus.Annales
de genetique 14,133 (1971)
44. Hathaway,W.E., J.H.Githens,W.R.Blackburn, V.
Fulginiti and C.H.Kempe: Aplastic Anaemia,
histiocytosis and erythrodermia in immu-
nologically deficient children (Probable
runt disease) New.Engl.Med.273,953 (1965)
45. Havemann,K.,H.M.Dosch und S.Bürger:
Phytohämagglutinin (PHA) und serumproteine
in der Lymphozytenkultur. Z.ges.exp.Med.
153, 297 (1970)
46. Heilmann, D.H.: Mitogenic activity of bacterial
fractions in lymphocyte cultures (Endoto-
xins and other derivates of gram-negative-
bacteria) Int.Arch.Allergy 39,145 (1970)
47. Hess, M.W.: Lymphatischer Apparat, insbesondere
Thymus, in der Pathogenese der Defektimmu-
nopathien. In: Handbuch der allgemeinen
Pathologie VII, Teil 3,179.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1970)
48. Hirschhorn, K., R.R.Schreibmann, S.Verbo and
R.H.Gruskin: The action of Streptolysin S
on peripheral lymphocytes of normal sub-
jects and patients with rheumatic fever.
Proc.Nat.Acad.Sci. 52,1151 (1964)
49. Hong, R., H.E.M.Kay, M.D.Cooper,H.Menwissen,
M.J.G.Allan, R.A.Good: Immunological resti-
tution in lymphopenic immunological defi-
ciency syndrome. Lancet 1,503 (1968)
50. Hungerford, D.A., A.J.Donelli,P.C.Nowell and
S.Beck: The chromosome constitution of
human phenotype intersex.
Amer J.Hum.Gen.11,215 (1959)
51. Kadowaki, J., W.W.Huelzer,R.I.Thompson, D.Gruher:
XX / XX Lymphoid chimaerism.in congenital
immunological deficiency syndrome with
thymic aplasia. Lancet 2,1152 (1965)
52. Kay, H.E.M. and C.Margoles: Chromosomes of human
fetal lymphocytes: Frequency of abnormali-
ties and absence of maternal cells.
Lancet 2,733 (1971)

53. Kay, H.E.M., M.M.Wolfendale and J.H.L.Playfair:
Thymocytes and phytohaemagglutinin
Lancet 2,804 (1966)
54. Lamvik, J.O.: The reactivity of human cord lymphocytes in mixed cell cultures.
Scand.J.Haematol. 3,325 (1966)
55. Landsteiner, K., and M.W.Chase: Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds.
Proc.Soc.exp.Biol.Med.49,688 (1942)
56. Lawrence, H.S. in: Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity states. H.S.Lawrence ed., Hoeber, Div. of Harper and Row (1959)
57. Leikin, S., J.Whang-Peng and J.J.Oppenheim: In vitro Transformation of cord blood lymphocytes by antigens. Ped.Res.4,437 (1970)
58. Leikin, S. and J.J.Oppenheim: Prenatal sensitization. Lancet 2,876 (1971)
59. Lindahl-Kiessling, K. and J.A.Böök: Effects of phytohaemagglutinin on leucocytes.
Lancet 2,591 (1964)
60. Ling, N.R. and P.J.L.Holt: The activation and reactivation of peripheral lymphocytes in cultures. J.Cell.Sci. 2,57 (1967)
61. Ling, N.R. and E.M.Husband: Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes. Lancet 2,363 (1964)
62. Ling, N.R.: Lymphocyte stimulation. North Holland Publishing Comp.Amsterdam (1968)
63. Lischner, H.W. and H.H.Panett: Phytohaemagglutinin and thymic lymphocytes.
Lancet 2,640 (1966)
64. Maini, R.N., A.D.M.Bryceson, R.A.Wolstencroft and D.C.Dumonde: Lymphocyte mitogenic factor in man. Nature 224,43 (1969)
65. Macini, R., J.P.Vaermann, A.O.Carbonara, J.F.Heremans: A single-radial-diffusion method for the immunological quantitation of proteins, in Protides of the Biological Fluid. Amsterdam, Els.Publishing Comp.370 (1963)
66. Marshall, W.H., F.T.Valentine and H.S.Lawrence: Cellular immunity in vitro (Clonal proliferation of antigen-stimulated lymphocytes) J.exp.Med. 130,327 (1969)
67. Maximow, A.A.: Betr. Pathol.Anat.Allgem.Pathol. 32 Supp.5 (1902) quoted by Coulson (1966)

68. Maximow, A.A.: Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postnatalen Leben der Säugetiere. Folie haemat. (Lpz) 8, 125 (1909)
69. Mellmann, W.J. and H.M. Rawnsley: Blastogenesis in peripheral blood lymphocytes in response to phytohaemagglutinin and antigens. Federation Proc. 25, 1720 (1966)
70. Moorhead, P.S., P.C. Nowell, W.J. Mellmann, D.M. Batts and D.A. Hungerford: Chromosomes preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exptl. Cell Res. 20, 613 (1960)
71. Mössner, G.: Grundzüge der rationellen Antibiotikatherapie. Med. Klinik 66, 1507 (1971)
72. Naiman, J.L., H.H. Punnett, H.W. Lischner, M.L. Destine and J.B. Arey: Possible graft-versus-host reaction after intrauterine transfusion for Rh erythroblastosis fetalis. New Engl. J. Med. 281, 697 (1969)
73. Neter, E., Bertram L.F. and C.E. Arbesman: Demonstration of Escherichia coli O55 and O111 antigens by means of haemagglutination test. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 255 (1952)
74. Nowell, P.C.: Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20, 462 (1960)
75. Oehme, J.: Immunologische Reifungsprobleme. Monatszeitschrift f. Kinderheilkunde 112, 97 (1964)
76. Oehme, J., H. Hundeshagen und C. Eschenbach: Über die Passage markierter Leucocyten vom Muttertier zum Foeten - zugleich ein Beitrag zur Runt Disease. Klin. Wschr. 44, 430 (1966)
77. Oehme, J.: Immunisatorische Besonderheiten in der Perinatalzeit: Antigentoleranz und Fremdzellensensibilisierung. Fortschritt der Pädologie 55 (1965)
78. Oehme, J.: Das Schicksal der transplazentar übergetretenen mütterlichen Lymphocyten im Organismus des Kindes. Mschr. Kinderheilk. 115, 149 (1967)
79. Olding, L.: Materno-foetal transfer of lymphocytes in human subjects. Acta path. microbiol. scand 76, 150 (1969)
80. Oppenheim, J.J.: Relationship of in vitro transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs and man. Yed. Proc. 27, 21 (1968)

81. Oppenheim, J.H. and S. Perry: Effect of endotoxin in cultured leucocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 1014 (1965)
82. Oppenheim, J.J., M. Barlow, Th. A. Waldmann and J. B. Block: Impaired in vitro lymphocyte transformation in patients with ataxia teleangiectasia *Brit. Med. J.* 330 (1966)
83. Papiernik, M. and C. Nezeloff: La promotion immunitaire du foetus humain. *Arch. Franc. Pd.* 27, 777 (1970)
84. Pearmain, G., R. R. Lycette and P. H. Fitzgerald: Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *Lancet* 1, 637 (1963)
85. Pisciotto, A. V., D. W. Westring, C. D. Prey and B. Walsch: Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature* 215, 193 (1967)
86. Prindull, G.: An in vitro quantitative study of phytohaemagglutinin (PHA) induced transformation of lymphocytes from premature newborn infants, from older premature infants and from full-term newborn infants. *Blut*, 23, 7 (1971)
87. Pulvertaft, R. J. V. and I. Pulvertaft: Spontaneous transformation of lymphocytes from umbilical-cord vein. *Lancet* 2, 892 (1966)
88. Quick, C. A. and T. D. Brogan: Gram-negative rods and surgical infections. *Lancet* 1, 1163 (1968)
89. Revillard, J. P.: Reflexions sur le conditions et les consequences de l'activation des lymphocytes. *CMI.* 46, 447 (1970)
90. Rigas, D. A. and E. E. Osgood: Purification and properties of phytohaemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *I. Biol. Chem.* 212, 606 (1955)
91. Roitt, I.: Essential immunology. Blackwell scientific publications, London (1971)
92. Salvin, S. B., M. B. Greff and R. F. Smith: Hypersensitivity in newborn guinea pigs. *J. Exp. Med.* 115, 707 (1962)
93. Silverstein, A. M., J. W. Uhr, K. L. Kraner and R. J. Kukes: Fetal response to antigenic stimulus. *J. Exp. Me.* 117, 799 (1963)
94. Smith, R. T., E. S. Platou and R. A. Good: Septicemia of the newborn. *Pediatrics* 17, 549 (1956)
95. Sørensen, S. F., V. Andersen and J. Giese: Studies on the quantitation of lymphocyte response in vitro. *Acta path. micr. Scan.* 76, 259 (1969)

96. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1968)
97. Swineburne, L.M.: Leucocyte antigens and placental sponge. Lancet 2, 592 (1970)
98. Walknowska, J., F.A. Conte and M.M. Grumbach: Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer
Lancet 1, 1119 (1969)
99. Wilson, J.A.: Phytohaemagglutinin and thymic lymphocytes. Lancet 2, 52 (1966)
100. Winter, G.C.B., A.B. Byles and J. Yoffey: Blood lymphocytes in newborn and adult.
Lancet 2, 932 (1965)
101. Xanthou, M.: Leucocyte blood picture in healthy full-term and premature babies during neonatal period.
Arch. Dis. Childhood 45, 242 (1970)
102. Yam, L.T., G.L. Castoldi and W.J. Mitus: Quantitative evaluation of phytohaemagglutinin stimulated lymphocyte cultures.
J. Lab. & Clin. Med. 70, 699 (1967)

Anhang:

103. Gluck, L., H.F. Wood and M.D. Fousek:
Pediat, Clin. N. Amer. 1131 (1966)
104. Humphrey, J.H. and R.G. White:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1971)
105. Keuth, U.: Zur Neugeborenensepsis.
Ref. Tag. Südd. Kinderärzte (Frankfurt/M. 1967)
106. Marget, W.: Zur Frage der Therapie und Prophylaxe schwerer Infektionen im Neugeborenenalter
Dtsch. med. Wschr. 41, 1848 (1967)
107. Marget, W. und B. Belohradsky: Diagnostik, Klinik und Therapie der Neugeborenen-Infektionen.
Der Gynäkologe 4, 222 (1971)
108. Betke, K. und T. Sanguanserm Sri:
Zytologische Blutfarbstoffdifferenzierung
Münch. med. Wschr. 23, 1099 (1972)

Herr Professor Dr.Marget hat mir freundlicherweise das Thema überlassen und zur Durchführung der Versuche die Einrichtungen seines Institutes zur Verfügung gestellt. Dafür und für die mit der Korrektur verbundene Mühe bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Bei der Durchführung der Experimente stand mir mit Rat und Tat Herr Dr.med. Belohradsky zur Seite. Er gab mir wertvolle Hinweise für die inhaltliche und formale Gestaltung der Arbeit. Dafür möchte ich ihm besonders herzlich danken.

Ebenso gilt mein bester Dank allen den mediz. techn. Angestellten des bakteriologischen Labors, die mir bei den Versuchen behilflich oder so nett waren, mir für meine Untersuchungen ihr Blut zu spenden.

L e b e n s l a u f

Personalien:

Cornelie Elisabeth Burr
geboren 20.9.1946 in
Heidenheim-Mergelstetten/Brenz
Eltern: Hans und Martha Burr
Geschw.: 2 Brüder, 1 Schwester
Wohnort: Staufen/Krs.Dillingen/Do.

Schuldbildung:

1954 -1958 Volksschule
1958 -1966 Gymnasium
Juli 1966 Abitur im Hellenstein-
Gymnasium Heidenheim

Studium:

Wintersemester 1966/67 Philosophie
und Germanistik an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
ab Sommersemester 1967 Medizin
an derselben Universität
Vorphysikum April 1968
Physikum Oktober 1969
Staatsexamen Juli 1973

